
CALIX[4]AREN-DIMERE ZUR DNA-ERKENNUNG IN DER GROßEN FURCHE

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Caroline Julia Blecking

geboren in Velbert

Institut für Organische Chemie
der
Universität Duisburg-Essen

Essen 2010

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader in der Zeit von Oktober 2006 bis März 2010 an der Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen, Standort Essen, durchgeführt.

Diese Arbeit wurde am 26. April 2010 eingereicht und am 05. Mai 2010 von der Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen als Dissertation angenommen.

Erstgutachter:	Prof. Dr. Thomas Schrader
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Gebhard Haberhauer
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Hans-Curt Flemming

Tag der Disputation: 07. Juni 2010

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Calix[4]aren-Dimere zur DNA-Erkennung in der großen Furche“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im April 2010

Caroline Julia Blecking

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader für die interessante Aufgabenstellung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die mir eingeräumte Freiheit bei der Bearbeitung des Themas.

Herrn Prof. Dr. Gebhard Haberhauer danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Hans-Curt Flemming danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der WASAG-Stiftung für Studiensförderung für die Vergabe eines Stipendiums und bei der Werdelmann-Stiftung für die Zuwendung durch Sachmittel.

Herrn Heinz Bandmann und Herrn Dr. Torsten Schaller danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Aufnahme der NMR-Spektren und für die stetige Diskussionsbereitschaft. Herrn Dr. Torsten Schaller danke ich außerdem für die Anfertigung der Molecular Modelling-Strukturen.

Herrn Klaus Kowski danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Lösung von technischen Problemen aller Art und Frau Heike Wöll für die Durchführung der GPC.

Herrn Werner Karow und Herrn Winfried van Hoof danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Bei Frau Petra Schneider, Frau Dr. Eva Ziegler und Frau Christine Kallweit bedanke ich mich für die Aufnahme der CD-Spektren.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitskreise Schrader und Haberhauer bedanke ich mich für die ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre, die gegenseitige Unterstützung und Hilfe bei Problemen jeglicher Art. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Jolanta Polkowska, Frau Kirstin Wenck, Frau Dr. Katrin Hochdörffer, Herrn Dr. Sun Wei, Herrn Kai Bernitzki und Frau Constanze Wilch.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Marc, der mir während der gesamten Doktorarbeit stets geduldig mit viel Liebe, Kraft und Verständnis zur Seite stand und mir immer wieder Mut gemacht hat. Darüber hinaus möchte ich mich für sein unermüdliches Korrekturlesen und die zahlreichen Anregungen bedanken. Ohne seine liebevolle Unterstützung wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen.

Für Marc

Teile dieser Arbeit sind publiziert, eingereicht oder auf Kongressen präsentiert worden:

Vortrag: C. J. Breitzkreuz, *Calix[4]aren-Dimere zur DNA-Erkennung in der großen Furche*, 12. Workshop “Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung” in Xanten am Niederrhein, 07.12.-09.12.2006.

C. J. Breitzkreuz, R. Zadnand, T. Schrader, DNA recognition with large calixarene dimers and varying spacers, *Supramolecular Chemistry* **2008**, 20, 109-115.

Poster: C. J. Breitzkreuz, T. Schrader, *DNA Recognition by Large Calixarene Dimers with Varying Bridging Units*, Conference on Supramolecular Approaches to Catalysis (Supracat), Barcelona, Spanien, 02.03.-05.03.2008.

*The path of scientific research is seldom straight,
often taking twists and turns
quite unexpected at the outset of an odyssey.
(C. David Gutsche, 1989)*

1. EINLEITUNG	- 1 -
1.1 Genexpression.....	- 1 -
1.2 DNA-Aufbau	- 3 -
1.3 DNA-Erkennung durch Interkalation.....	- 6 -
1.4 DNA-Erkennung durch Bindung am Zucker-Phosphat-Rückgrat	- 7 -
1.5 DNA-Erkennung in der kleinen Furche.....	- 8 -
1.6 DNA-Erkennung in der großen Furche	- 13 -
1.6.1 Erkennung durch Proteine.....	- 13 -
1.6.2 Erkennung durch künstliche Rezeptoren.....	- 16 -
1.6.3 Erkennung durch Oligonucleotide	- 17 -
1.6.4 Erkennung durch Peptidnucleinsäuren.....	- 18 -
1.7 Calixarene	- 19 -
1.8 Calix[4]aren-Dimere zur DNA-Erkennung	- 22 -
2. AUFGABENSTELLUNG.....	- 24 -
3. DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE.....	- 30 -
3.1 Methoden.....	- 30 -
3.1.1 Fluoreszenztitrationen.....	- 30 -
3.1.2 Ethidiumbromid- und DAPI-Verdrängungs-Assay	- 33 -
3.1.3 UV-Vis-Schmelzkurven.....	- 36 -
3.1.4 Circular-Dichroismus-Spektroskopie.....	- 39 -
3.2 Synthese der Dimere 1-7 und der zugehörigen Monomere.....	- 41 -
3.2.1 Synthese der Anilincalix[4]aren-Dimere 1-6 mit aliphatischen Spacern	- 41 -
3.2.2 Synthese des Guanidiniumcalix[4]aren-Dimers 7	- 46 -
3.2.3 Synthese der Calix[4]aren-Monomere M1 und M7	- 49 -
3.3 Bindungsstudien der Dimere 1-7 und Monomere M1 und M7.....	- 50 -
3.3.1 Fluoreszenztitrationen.....	- 50 -
3.3.2 Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay	- 62 -
3.3.3 DAPI-Verdrängungs-Assay	- 67 -

3.3.4	UV-Vis-Schmelzkurven.....	- 69 -
3.3.5	CD-Spektroskopie.....	- 77 -
3.3.6	Molecular Modelling	- 83 -
3.3.7	¹ H-NMR-Studien mit dem Dickerson-Dodecamer und Dimer 1	- 91 -
3.3.8	Weiterführende Untersuchungen	- 98 -
3.3.7	Untersuchung von 1 , 4 und M1 auf ihren antiproliferativen Effekt gegenüber Tumorzelllinien. -	101 -
3.4	Funktionalisierung des Calix[4]arens 9 am unteren Rand mit Polyglycoleinheiten	
	- 105 -
3.5	Synthese eines Dimers mit Tripyrrolspacer.....	- 111 -
3.5.1	Synthese der <i>N</i> -Methylpyrrol-Monomerbausteine.....	- 111 -
3.5.2	Synthese des Tripyrrols 53	- 114 -
3.5.3	Synthese des Calix[4]aren-Dimers 55 mit einem Monopyrrolspacer	- 116 -
3.5.4	Kupplungsreaktionen des Calix[4]arens 13 mit dem Tripyrrolspacer 53	- 117 -
3.5.5	Alternative Synthesewege zu einem Calix[4]aren-Dimer mit Tripyrrolspacer	- 119 -
3.5.6	Synthese der Calix[4]aren-Dimere 79 und 80 mit Tripyrrolspacern.....	- 126 -
3.6	Bindungsstudien mit den Dimeren 55, 79 und 80.....	- 130 -
3.6.1	Fluoreszenztitrationen.....	- 130 -
3.6.2	Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay	- 136 -
3.6.3	DAPI-Verdrängungs-Assay	- 137 -
3.6.4	UV-Vis-Schmelzkurven.....	- 139 -
3.6.5	CD-Spektroskopie.....	- 142 -
3.6.6	Molecular Modelling	- 144 -
4.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	- 147 -
5.	EXPERIMENTELLER TEIL.....	- 156 -
5.1	Materialien.....	- 156 -
5.2	Methoden.....	- 158 -
5.3	Synthesen.....	- 161 -
5.3.1	Synthese der monomeren Calix[4]arene	- 161 -
5.3.2	Synthese der wasserlöslichen Calix[4]arene	- 174 -
5.3.3	Synthese der Diaminosäurespacer 25 und 26	- 180 -
5.3.4	Synthese der Boc-geschützten Anilincalix[4]aren-Dimere	- 182 -
5.3.5	Synthese der Anilincalix[4]aren-Dimere 1 bis 6	- 191 -
5.3.6	Synthese der Guanidiniumcalix[4]aren-Dimere 30 und 7	- 203 -

5.3.7	Synthese der Pyrrolmonomere	- 206 -
5.3.8	Synthese der Calixaren-Dimere mit einer Pyrroleinheit	- 214 -
5.3.9	Synthese der Polypyrrolbausteine 48 bis 51	- 217 -
5.3.10	Synthese der Pyrrolbausteine 57 bis 59	- 224 -
5.3.11	Synthese der monofunktionalisierten Calixarenhalbschalen	- 230 -
5.3.12	Synthese der Tripyrrolkomponenten 70-76 und der Tripyrrolcalix[4]aren-Dimere 78-81	- 238 -
5.4	Bindungsexperimente mit den Calixaren-Dimeren und -Monomeren.....	- 254 -
5.4.1	Fluoreszenztitrationen	- 254 -
5.4.2	Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assays	- 325 -
5.4.3	DAPI-Verdrängungs-Assays	- 326 -
5.4.4	UV-Vis-Schmelzkurven	- 327 -
5.4.5	CD-Spektroskopie	- 327 -
5.4.6	¹ H-NMR-Studien mit dem Dickerson-Dodecamer und Dimer 1	- 328 -
6.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	- 330 -
7.	LITERATURVERZEICHNIS	- 333 -

1. Einleitung

1.1 Genexpression

Nucleinsäuren sind in allen Lebewesen für die Speicherung, Weitergabe und Expression von genetischen Informationen verantwortlich. Dabei ist die genetische Information in der Basensequenz der DNA niedergelegt. Ein DNA-Abschnitt, in dem die notwendige Information zur Herstellung eines funktionellen biologischen Produkts codiert ist, wird als Gen bezeichnet.^[1]

Die meisten Gene codieren für Proteine, d. h. sie enthalten die Information für die Aminosäuresequenz eines Proteins.

Zur Expression eines Gens, d. h. zur Synthese des codierten Proteins, muss die Sequenzinformation der DNA in eine Aminosäuresequenz umgesetzt werden. Nach dem zentralen Dogma der Molekularbiologie wird hierzu ein Teil des Gens in eine RNA umgeschrieben (transkribiert), und die in der sogenannten mRNA (messenger RNA) enthaltene genetische Botschaft an den Ribosomen (katalysiert durch ribosomale RNA, rRNA) auf die Proteine übertragen (Proteinbiosynthese, Translation). Dabei codieren immer drei Nucleinbasen (Codon) für jeweils eine der 20 proteinogenen Aminosäuren.^[1, 2] Die für die Proteinbiosynthese benötigten Aminosäure-Monomere werden von tRNAs (transfer RNAs) transportiert. In Abbildung 1 wird der Vorgang der Transkription und Translation schematisch dargestellt.

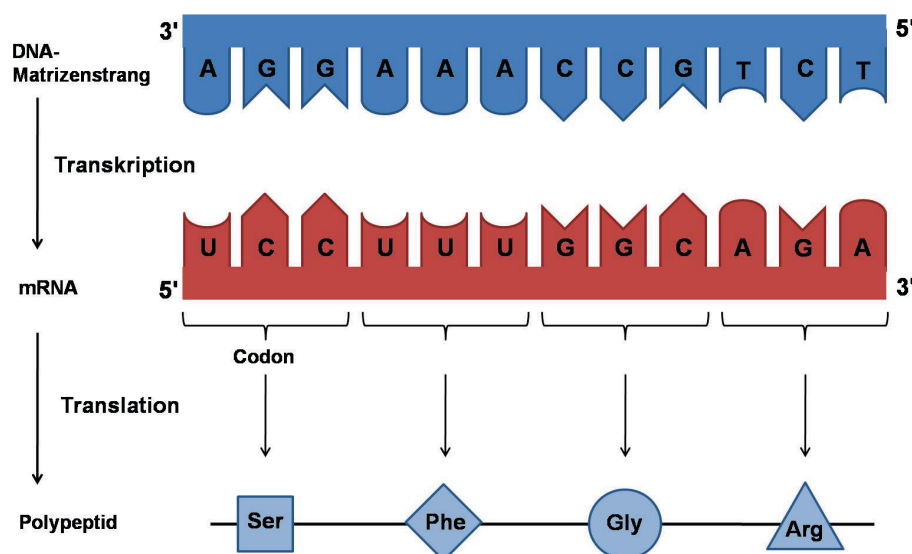


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Transkription und Translation.

Die Transkription aller Gene wird genau gesteuert, damit das dabei entstehende Produkt nur in der benötigten Menge hergestellt wird. Dabei wird die Expression der DNA-Information durch Proteine, die reversibel und nicht-kovalent an die DNA binden, die sogenannten Transkriptionsfaktoren, reguliert. Sie können den Vorgang der Transkription fördern oder hemmen, indem sie in der großen Furche der DNA eine bestimmte Sequenz erkennen und an ihr binden.^[1, 2] Einzelne Gene können so gezielt an- oder abgeschaltet werden.

Erst kürzlich wurde herausgefunden, dass RNA im Organismus nicht nur in einzelsträngiger Form als Informationsträger fungiert, sondern in Form von doppelsträngiger siRNA (small interference RNA) durch Bindung an einen Proteinkomplex und dortiger Erkennung von mRNA mit anschließender Spaltung derselben, die eukaryotische Genexpression inhibieren kann. Für die Entdeckung dieses Prozesses der RNA-Interferenz (RNAi) im Jahre 1998, wurden *A. Z. Fire* und *C. C. Mello* 2006 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.^[3-5]

In diesem Zusammenhang ist eine Entwicklung von DNA- oder auch RNA-bindenden künstlichen Molekülen, die in die Genexpression eingreifen können, von signifikanter medizinischer Bedeutung, da so Krankheiten, die als Folge eines (vererbaren) genetischen Defekts auftreten, wie z.B. die cystische Fibrose, das Tay-Sachs-Syndrom, die Huntington-Krankheit, sowie diverse Tumore, geheilt werden könnten.^[2, 6]

Schon jetzt machen DNA-Binder einen großen Teil der in der Klinik verwendeten Antibiotika und vor allem Anti-Tumor-Mittel aus.^[7-9] Dabei beruht die Wirkung dieser Stoffe meist auf Interkalation (z.B. Doxorubicin) und/oder Zerstörung der DNA-Doppelhelix durch die Herbeiführung von DNA-Strang-Brüchen und Quervernetzungen zwischen DNA-Strängen (z.B. *cis*-Platin, Cyclophosphamid), und wird von einer Reihe von Nebenwirkungen begleitet. Bei der Entwicklung neuer potenter Wirkstoffe ist es von großer Bedeutung eine hohe Sequenzselektivität zu erreichen, um nur spezifische Gene an- und abzuschalten. Ein solch effizienter Eingriff in die Genexpression mit künstlichen Molekülen ist im Prinzip nur möglich, wenn diese in der großen Furche der DNA gebunden werden.

In der Natur kann die DNA-Erkennung über vier verschiedene Wege erfolgen: Durch Interkalation zwischen die Basenpaare^[10], über das Zucker-Phosphat-Rückgrat^[11-15] oder durch Bindung in der kleinen^[16-18] oder großen Furche.^[19-21] Diese möglichen Bindungswege werden in den folgenden Kapiteln ausführlicher dargestellt.

1.2 DNA-Aufbau

Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist aus Zuckermolekülen, den 2-Desoxy-D-ribosen, aufgebaut, die über jeweils eine Phosphatgruppe zu einer Kette verknüpft sind. Jeder Zucker ist durch eine *N*-glycosidische Bindung mit einer Nucleinbase verknüpft.^[22] Die Ribonucleinsäure (RNA) enthält im Gegensatz zur DNA den Pentose-Zucker D-Ribose.

Die in den Nucleinsäuren vorkommenden Basen sind aromatische Heterozyklen und leiten sich von Pyrimidin oder Purin ab.^[23] In der DNA kommen vier verschiedene Nucleinbasen vor: Die Purinbasen Guanin (G) und Adenin (A), sowie die beiden Pyrimidinbasen Thymin (T) und Cytosin (C). In der RNA nimmt die Pyrimidinbase Uracil den Platz der methylierten Base Thymin ein (siehe Abbildung 2).

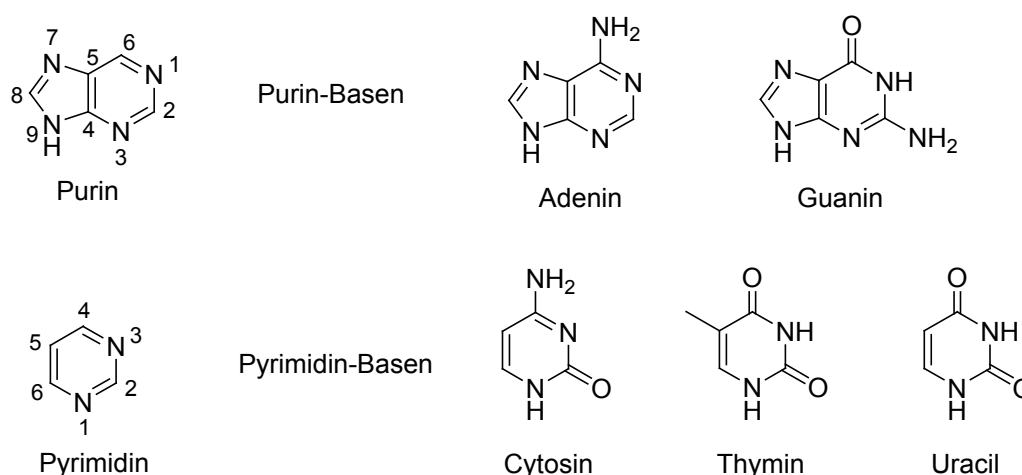


Abbildung 2: Struktur der DNA- und RNA-Nucleinbasen.

Die doppelsträngige doppelhelikale Struktur der DNA wurde 1953 durch *J. D. Watson* und *F. H. C. Crick* aufgeklärt.^[24] Die DNA-Doppelhelix kann unter verschiedenen Voraussetzungen (pH-Wert, Ionenstärke, Lösungsmittel) verschiedene Konformationen einnehmen, wobei die unter physiologischen Bedingungen vorkommende relevante Konformation die B-DNA ist, dargestellt in Abbildung 3.^[25] Diese Struktur besteht aus zwei helikalen, antiparallel verlaufenden Polynucleotidsträngen, die um eine gemeinsame Achse gewunden sind und eine rechtsgängige Doppelhelix bilden. Die hydrophilen anionischen Zuckerphosphat-Rückgrate liegen dabei jeweils auf der Außenseite der Doppelhelix. Die Purin- und Pyrimidinbasen beider Stränge sind im Inneren der Doppelhelix übereinander gestapelt und stehen nahezu senkrecht zur Längsachse. Ihre hydrophoben aromatischen Ringe liegen sehr eng beieinander, zwei benachbarte Basen haben einen Abstand von 0.34 nm.

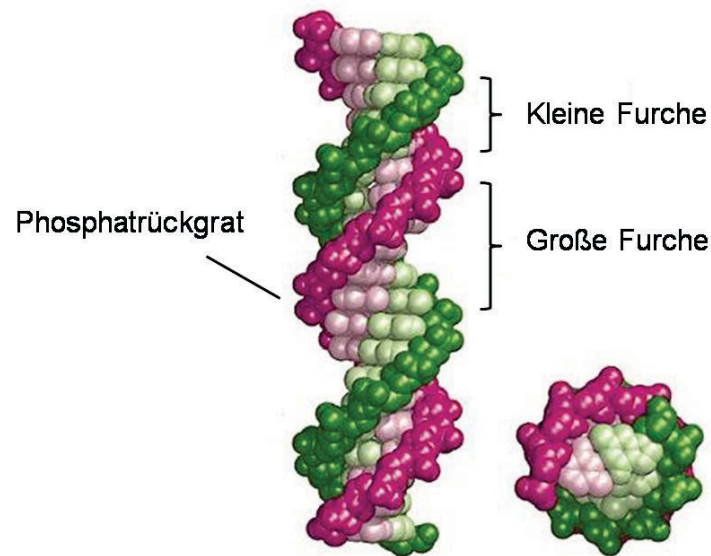


Abbildung 3: Ansicht der DNA-Doppelhelix.^[22]

Jede Nucleinbase in einem Strang ist mit einer komplementären Base des anderen Strangs durch Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft (*Watson-Crick-Basenpaarung*). Bei dieser spezifischen Basenpaarung ist Adenin immer mit Thymin über zwei Wasserstoffbrückenbindungen, Guanin stets mit Cytosin über drei H-Brücken verbunden. An jedem Basenpaar sind also eine Purin- und eine Pyrimidinbase beteiligt. Zusätzlich zu den spezifischen Wasserstoffbrücken wird die Doppelhelix durch π -Stapelwechselwirkungen zwischen den übereinanderliegenden Basen stabilisiert.

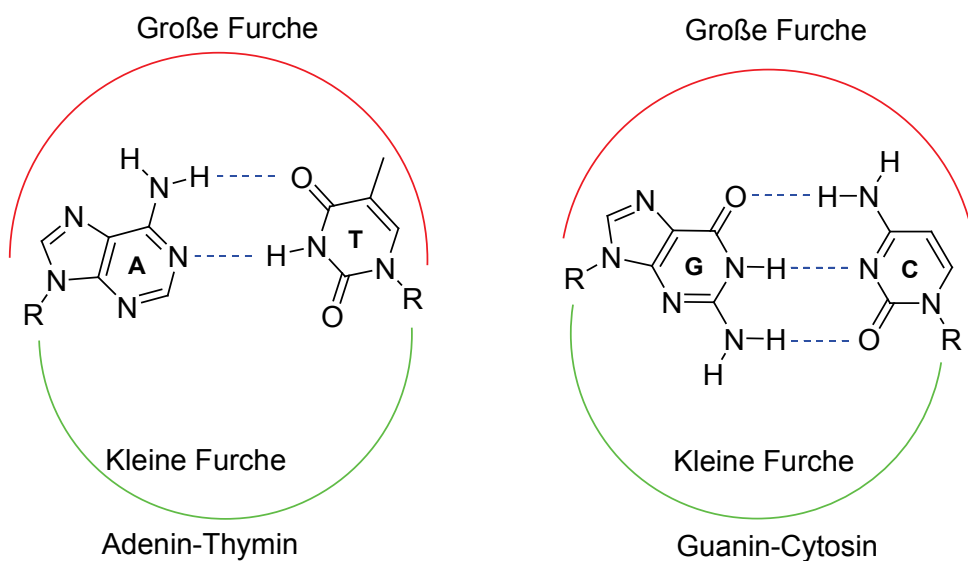


Abbildung 4: DNA-Basenpaarung nach Watson und Crick.

Die Helixstruktur wiederholt sich alle 3.4 nm, eine Windung umfasst 10 Basenpaare. Durch die spezifische Wendelform der beiden gepaarten Stränge bilden sich auf der Oberfläche der Doppelhelix eine breite große Furche (11.6 Å) und eine schmale kleine Furche (6.0 Å) von ähnlicher Tiefe (8.5 Å und 8.2 Å) aus (siehe Abbildung 3).

Außer der in der Natur vorkommenden B-DNA sind weitere DNA-Strukturen bekannt, darunter die A- und Z-DNA. Beide Formen wurden bisher nur *in vitro* beobachtet; es ist noch nicht geklärt, ob sie unter physiologischen Bedingungen vorkommen. Die A-DNA, welche durch Wasserverlust aus der B-DNA hervorgeht, ist ebenfalls eine rechtsgängige Doppelhelix mit antiparallel verlaufenden Strängen, die durch *Watson-Crick*-Basenpaarung zusammengehalten werden. Die Basenpaare liegen in der A-DNA etwas geneigt und nicht senkrecht zur Helixachse. Dadurch ist der Aufstieg der Helix reduziert, wodurch die Doppelhelix breiter und kürzer als in der B-DNA ist. Eine Helixwindung beinhaltet 11 Basenpaare. Durch die Neigung der Basenpaare ist die große Furche tief (13.0 Å) und schmal (2.2 Å), während die kleine Furche breit (11.1 Å) und sehr flach (2.6 Å) ist.^[1, 9] Die schlanke Z-DNA, die ihren Namen dem zickzackartigen Verlauf der Phosphatgruppen im Rückgrat verdankt, ist eine linksgängige Helix mit 12 Basenpaaren pro Windung. Sie wurde bisher nur bei GC-reichen Sequenzen *in vitro* unter erhöhtem Salzgehalt (4 M NaCl) beobachtet.^[1, 22] Die Konformation einer RNA-Doppelhelix stimmt mit der einer A-DNA-Helix überein. In Abbildung 5 sind die Konformationen von A- und B-DNA dargestellt.

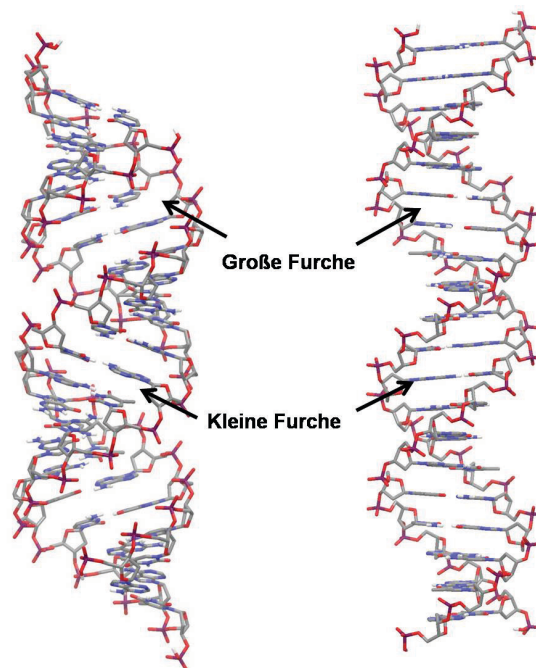


Abbildung 5: Struktur von A-DNA (links) und B-DNA (rechts).

1.3 DNA-Erkennung durch Interkalation

Die DNA-Erkennung findet sehr häufig durch Interkalation von kleinen aromatischen Molekülen zwischen die Basenpaare der DNA statt. Dabei beruht die Bindung des Interkalators auf π -Stapelwechselwirkungen durch eine maximale Überlappung mit den Basenpaaren. Elektrostatische Effekte machen ebenfalls einen großen Teil der Bindungsenergie aus, synthetische Interkalatoren tragen durchweg positive Ladungen.

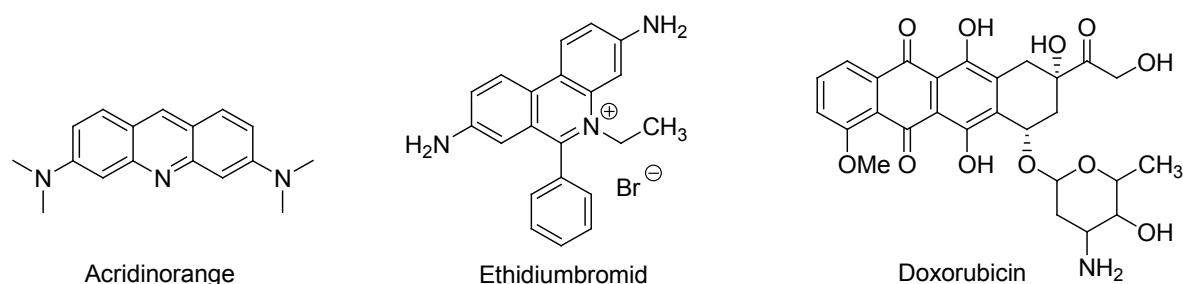


Abbildung 6: Beispiele für Interkalatoren.

In den 1960er Jahren fand *L. S. Lerman* heraus, dass die Einlagerung eines planaren aromatischen Moleküls (Acridin, Acridinorange) zu einer Aufweitung des Spalts zwischen den gestapelten Basenpaaren führt, was eine Konformationsänderung des DNA-Rückgrats bewirkt.^[26] Die Aufweitung verursacht eine Aufwicklung und eine Verzerrung des DNA-Moleküls. Das DNA-Rückgrat ist nicht ausreichend flexibel, um eine Einlagerung von Molekülen in jede Lücke zwischen die Basenpaare zu ermöglichen. Ist ein Zwischenraum gefüllt, müssen die angrenzenden ungefüllt bleiben, was eine maximale Einlagerung von einem Molekül pro zwei Basenpaare zur Folge hat. In Abbildung 7 ist die Einlagerung von zwei Doxorubicinmolekülen in Doppelstrang-DNA gezeigt.

Eine wichtige Anwendung von Interkalatoren ist neben der Verwendung als DNA-Färbemittel (z.B. Acridinderivate, Phenanthridinderivate wie Ethidiumbromid) ihr Einsatz als Anti-Tumor-Mittel in der Klinik. Dazu gehören die Interkalatoren Mitomycin und Bleomycin, sowie die Actinomycine und Anthracycline (Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin).^[9, 27, 28]

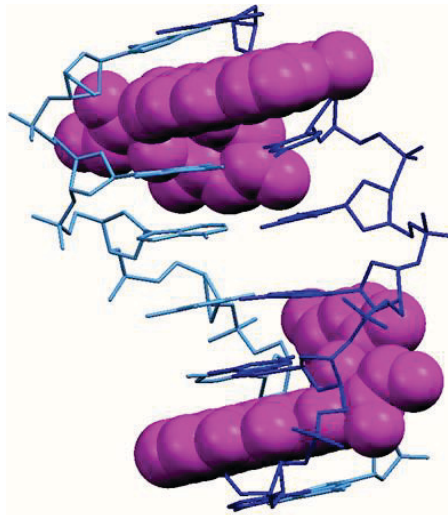


Abbildung 7: Interkalation von zwei Doxorubicinmolekülen (violett) in die DNA (blau).^[29]

Diese DNA-interagierenden cytotoxischen Mittel bilden oft DNA-Strang-Brüche aus und können so Tumorzell-DNA, aber auch normale Zell-DNA zerstören. Viele in der Chemotherapie zusätzlich zu den Interkalatoren eingesetzten Mittel, wie z. B. der bekannte Wirkstoff *cis*-Platin, binden kovalent an die DNA und hemmen durch Querverknüpfung zweier DNA-Stränge die DNA-Replikation.^[9, 28]

1.4 DNA-Erkennung durch Bindung am Zucker-Phosphat-Rückgrat

Natürliche mehrfach positiv geladene Polyamine, wie Spermin oder Spermidin, welche in mikromolaren Konzentrationen im Zellkern auftreten, binden unspezifisch am Zucker-phosphat-Rückgrat der DNA und bilden multiple Salzbrücken aus. Proteinwechselwirkungen mit dem Rückgrat begleiten oft eine Erkennung der DNA über die große oder kleine Furche. Meist sind es dann die kationischen Aminosäurereste, die elektrostatische Wechselwirkungen mit den Phosphat-Sauerstoffatomen ausüben.^[22]

Es gibt sehr wenige Berichte von synthetischen Reagenzien, die spezifisch an das DNA-Rückgrat binden. Dagegen wurden zahlreiche unspezifische kationische DNA-Bindemoleküle als Transfektionsreagenzien entwickelt, wie z.B. Amphiphile, Dendrimere und Polymere.^[12, 14, 15] Polythiophene, die ebenfalls das DNA-RNA-Rückgrat erkennen, wurden kürzlich als Farbsensoren für die Hybridisierung von Einzelstrang-DNA vorgestellt.^[30]

1.5 DNA-Erkennung in der kleinen Furche

Da in der großen Furche der DNA mehr funktionelle Gruppen der DNA-Basen erreichbar sind, als in der kleinen Furche, erkennen die meisten natürlichen Proteine die DNA über sequenzspezifische Wechselwirkungen in der großen Furche. Trotzdem gibt es wenige Proteine und kleine Moleküle, die in der kleinen Furche der DNA binden. Ein Beispiel für ein natürlich vorkommendes Protein ist das TATA-Bindeprotein (TBP), ein Transkriptionsfaktor, der bei der Initialisierung der Transkription eine entscheidende Rolle spielt.^[9, 28]

Zur Gruppe von Bindern in der kleinen Furche gehören die Naturstoffe Netropsin und Distamycin A, sowie synthetische Diarylamidine (wie z. B. DAPI und Berenil). Viele dieser Binder bevorzugen AT-reiche Sequenzen und stören im Gegensatz zu den Interkalatoren die DNA-Struktur nicht.^[9]

DAPI und Berenil (auch Diminazen), beide membrangängig und mit einer hohen Affinität zu AT-reichen Sequenzen, wurden in die Klinik als antiparasitäre Mittel eingeführt. Heutzutage wird lediglich Berenil in der Veterinärmedizin verwendet, um parasitäre Krankheiten, wie z. B. die Schlafkrankheit, zu heilen, da DAPI zu viele Nebenwirkungen aufweist.^[31] Es findet jetzt Anwendung als DNA-Färbemittel.

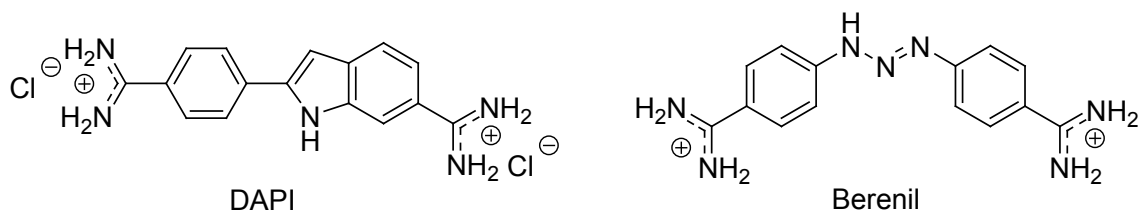


Abbildung 8: Strukturen von DAPI und Berenil.

Polyamide mit Pyrroleinheiten und terminal protonierten Stickstoffatomen präsentieren den Prototyp von DNA-Bindern in der kleinen Furche. Die aus zwei, beziehungsweise drei *N*-Methylpyrroleinheiten aufgebauten Polyamide Netropsin und Distamycin A waren die ersten bekannten Naturstoffe, die selektiv an AT-reiche Sequenzen in der kleinen Furche einer doppelhelikalen DNA binden. Beide Moleküle zeigen eine hohe Aktivität gegenüber speziellen Tumoren, Bakterien, Pilzen und Viren, finden jedoch aufgrund ihrer zu hohen Toxizität keinen klinischen Einsatz.^[32-34]

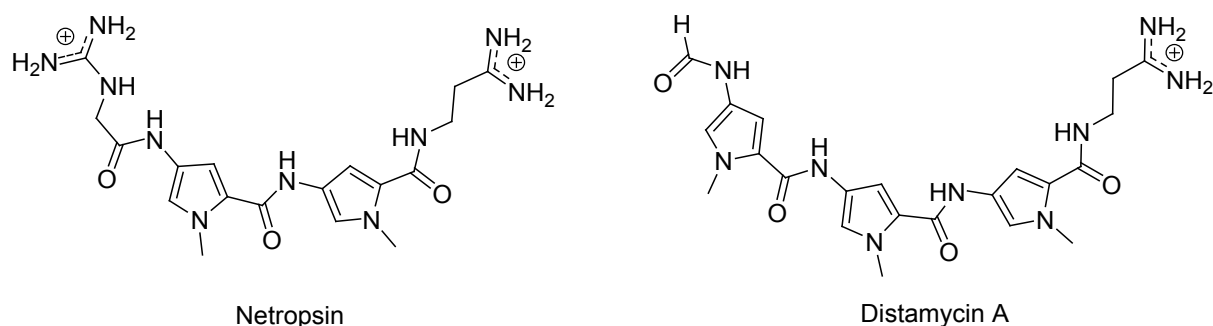


Abbildung 9: Strukturen von Netropsin und Distamycin A.

Im Jahr 1985 wurde die erste Röntgenstruktur eines Netropsin-DNA-Komplexes von *Dickerson* erhalten.^[35] Es zeigte sich, dass sich das Netropsin-Molekül aufgrund seiner gekrümmten Gestalt genau in die kleine Furche der Doppelhelix einlagern kann und mit seinen Amidprotonen spezifische Wasserstoffbrücken mit A·T- und T·A-Basenpaaren eingeht. Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen konnte von *D. E. Wemmer* gezeigt werden, dass das Naturprodukt Distamycin A sowohl als 1:1, als auch als antiparalleler 2:1-Komplex, an AT-reiche Sequenzen der DNA bindet (siehe Abbildung 10).^[36]

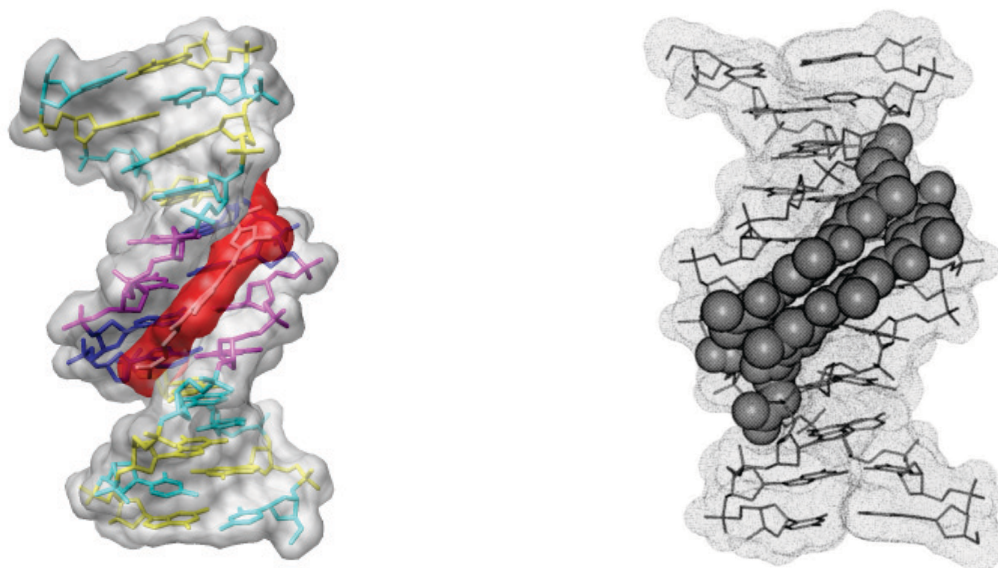


Abbildung 10: Einlagerung von Netropsin^[37] (links) und zwei Molekülen Distamycin A^[17] (rechts) in die kleine Furche der DNA.

Durch die Einlagerung zweier Distamycin-Moleküle können die Basen beider Stränge erkannt werden, also das ganze Basenpaar. Der Ligand wird aufgrund elektrostatischer und hydrophober Wechselwirkungen mit der DNA aus der Lösung in die kleine Furche der Doppelhelix transferiert. Da Distamycin positiv geladen ist, wird gleichzeitig ein positiv geladenes Gegenion aus der DNA freigesetzt. Im nächsten Schritt kann das eingelagerte Substrat dann eine Vielzahl molekularer Wechselwirkungen mit der DNA eingehen. Die sequenzspezifische Bindung ist dabei im Allgemeinen von einer Kombination aus Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen sowie von Van-der-Waals-Kontakten abhängig.^[19]

Auf der Basis dieser natürlichen Oligoamide entwickelte die Gruppe um *P. B. Dervan* eine ganze Reihe an Netropsin- und Distamycin-Analoga, die paarweise alle vier *Watson-Crick*-Basenpaare selektiv erkennen können.^[17, 38, 39] Dabei wurden sogenannte Hairpin-Moleküle entwickelt, in denen zwei Polyamidstränge über einen flexiblen Linker zu einem antiparallelen Dimer kovalent verbunden sind.^[40, 41] Abbildung 11 zeigt die spezifischen Positionen von Wasserstoffbrücken-Donatoren und Wasserstoffbrücken-Akzeptoren an jedem Watson-Crick-Basenpaar in der kleinen Furche.

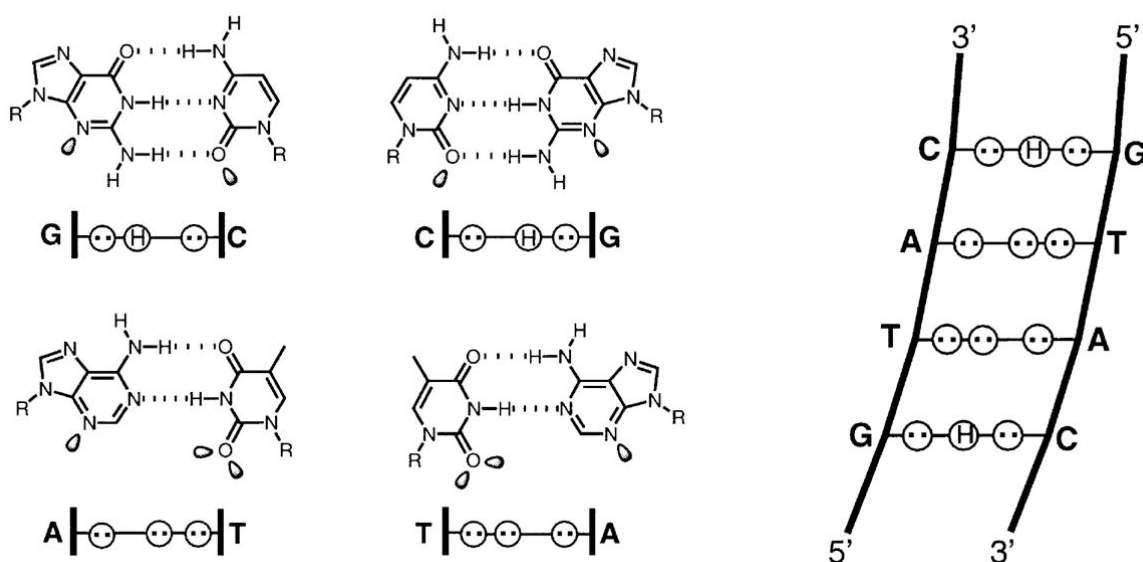


Abbildung 11: Wasserstoffbrücken-Donatoren und Akzeptoren in der kleinen Furche der DNA. Kreise mit Punkten repräsentieren die freien Elektronenpaare (Wasserstoffbrücken-Akzeptoren), Kreise mit einem H Wasserstoffatome (Wasserstoffbrücken-Donatoren).^[17]

In einem Hairpinoligopeptid wechselwirken die sich gegenüberstehenden Heterozyklen mit jeweils einem Basenpaar (siehe Abbildung 12). Dabei erkennen zwei Pyrroleinheiten (Py/Py) A·T- und T·A-Basenpaare (nicht gezeigt). Um eine Selektivität für GC-Basenpaare zu erhalten, wurde ein Pyrrolring (Py) durch ein Imidazol (Im) ersetzt, welches eine zusätzliche Wasserstoffbrücke mit der exocyclischen Amino-Gruppe des Guanins auszubilden vermag. Ein Im/Py-Paar bindet nur an G·C-, nicht an C·G-Basenpaare.^[6, 42] Da das Pyrrolmotiv Py/Py nicht zwischen A·T- und T·A-Basenpaaren unterscheiden kann, wurde ein dritter Monomertyp, *N*-Methyl-3-Hydroxypyrrol (Hp) eingeführt. Dieses ist in der Lage, mit seiner Hydroxylgruppe Wasserstoffbrückenbindungen mit der Carbonylgruppe des Thymins einzugehen, so dass ein Hp/Py-Paar an T·A, aber nicht an A·T binden kann.^[38, 39, 43-47]

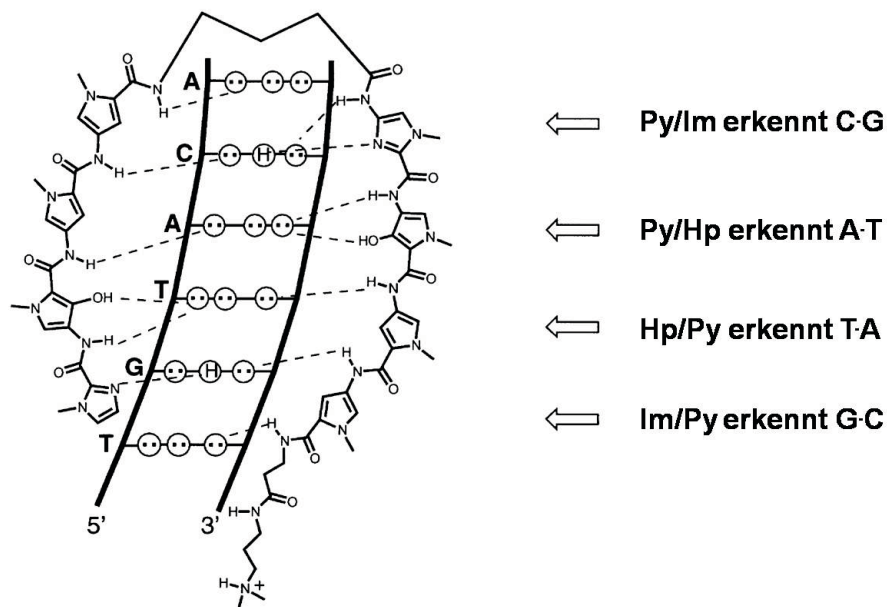


Abbildung 12: Molekulare Erkennung in der kleinen Furche der DNA mit einem Hairpinmolekül.^[17]

Durch die Verwendung dieser einfachen „Paarungsregeln“ war es möglich, Polyamidliganden zu entwickeln, die eine spezifische DNA-Sequenz von 4-7 Basenpaaren in der kleinen Furche erkennen können. Einige dieser Komponenten sind in der Lage, die Genexpression auf dem Level der Transkription zu regulieren.^[28, 48]

In Tabelle 1 ist der sogenannte Paarungscode in der kleinen Furche zusammengefasst.

Tabelle 1: *Paarungscode für die Erkennung in der kleinen Furche.*

	A·T	T·A	C·G	G·C
Py/Py	+	+	-	-
Im/Py	-	-	-	+
Py/Im	-	-	+	-
Hp/Py	-	+	-	-
Py/Hp	+	-	-	-

In zellfreien Assays konnte gezeigt werden, dass zwei der synthetisierten Polyamide durch Bindung an einem spezifischen Genabschnitt eines viralen HIV-1-Gens dessen Transkription hemmen können, indem sie die Andockung von Transkriptionsfaktoren inhibieren. Auch in isolierten menschlichen Blutzellen konnte eine Inhibierung der viralen Replikation erreicht werden, ohne die Zellvitalität zu beeinträchtigen.^[49]

Da die meisten Polyamid-Studien in zellfreien Assays durchgeführt wurden und der Transport der Polyamide in den Zellkern bisher weniger erfolgreich verlief, müssen diese vielversprechenden Systeme in Zukunft weiterentwickelt werden, um eine klinische Anwendung verwirklichen zu können. Obwohl die DNA-Bindung vieler Proteine durch die Polyamide erfolgreich inhibiert werden konnte, bleibt trotzdem die Herausforderung mit Proteinen zu konkurrieren, die in der großen Furche binden und in ihrer Aktivität nicht durch kleine-Furche-Binder eingeschränkt werden.

1.6 DNA-Erkennung in der großen Furche

1.6.1 Erkennung durch Proteine

Die selektive Erkennung von DNA in der großen Furche durch Proteine spielt eine zentrale Rolle in der Genexpression. Durch die sogenannten Transkriptionsfaktoren werden die Transkription und ihre Regulation gesteuert.

Die sequenzselektive DNA-Erkennung durch Proteine ist ein sehr komplexer Vorgang, der nach keinen erkennbaren Regeln oder Mustern verläuft. Eine Imitation ist aus diesem Grund nur schwer erreichbar. Es gibt verschiedene Proteinmotive, wie z. B. das Zinkfinger-Motiv, das Leucin-Zipper-Motiv, die Helix-Turn-Helix- und Helix-Loop-Helix-Struktur, in denen meist eine α -Helix von zylindrischer Gestalt die DNA-Basen in der großen Furche über bestimmte Aminosäurereste erkennt.^[22, 50] Prinzipiell geht jede dritte oder vierte Aminosäureseitenkette der α -Helix Kontakte mit den Basenpaaren ein. Jede DNA-Base kann durch mehrere Aminosäurereste über Wasserstoffbrücken erkannt werden, es gibt also keine 1:1-Aminosäure-DNA-Basen-Korrespondenz.^[51] Allerdings gibt es Aminosäure-Seitenketten, die bevorzugt Wechselwirkungen mit den Nucleinbasen eingehen, darunter diejenigen der basischen Aminosäuren Arginin (Guanidingruppe) und Lysin (Aminogruppe), die Amid-Reste von Glutamin und Asparagin, sowie die Hydroxygruppe des Serins. Dabei vermögen die Aminosäuren Arg, Asn und Gln bidentale Wasserstoffbrücken zu den Purinbasen Adenin und Guanin einzugehen. Weniger häufig werden schwache Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Basen und den aromatischen Ringen von Phe, Tyr und Trp ausgebildet.

Neben den Wasserstoffbrückenbindungen mit den Basenpaaren in der großen Furche gehen DNA-bindende Proteine noch weitere Wechselwirkungen mit der DNA ein, um die thermodynamische Stabilität des Komplexes zu erhöhen und die Erkennungsdomäne in der korrekten Anordnung festzuhalten.^[25] Hier seien die Wechselwirkungen zwischen dem Phosphatrückgrat und basischen Aminosäureseitenketten (Lys, Arg, His), nichtpolare Kontakte zwischen DNA-Basenpaaren (Methylgruppe von Thymin, heterocyclische C-Atome in den Purin- und Pyrimidinringen) mit hydrophoben Aminosäureseitenketten, sowie direkte Kontakte der Aminosäurereste mit den Basen in der kleinen Furche erwähnt.^[25]

Interessanterweise sind Zinkfinger- und Leucinzipper-Motive von ähnlicher Dimension und Topologie. Beide Motive bestehen aus einem großen Zylinder aus basischen Aminosäuren mit einer polar protischen Oberfläche, die die Nucleinbasen am Grund der großen Furche ablesen kann.

Das Leucin-Zipper-Motiv, gezeigt in Abbildung 13, besteht aus zwei α -Helices, in denen am C-Terminus in regelmäßigen Abständen Leucinreste auftreten, die hydrophobe Wechselwirkung miteinander eingehen und ein Dimer bilden. Da die beiden α -Helices wie ein Reißverschluss (engl.: Zipper) zusammengehalten werden, wird das Motiv als Leucin-Zipper bezeichnet. Die DNA-Bindedomäne liegt am N-Terminus der beiden α -Helices und beinhaltet besonders viele basische Aminosäuren, die mit den DNA-Basen starke Wechselwirkungen eingehen.^[28, 52]

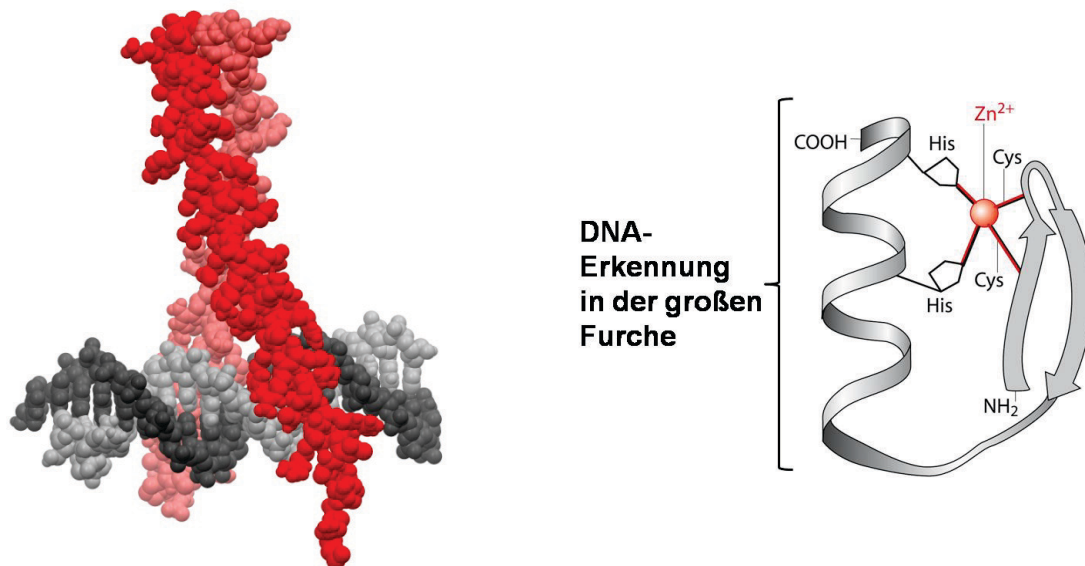


Abbildung 13: DNA-Erkennungseinheiten. Links: Leucinzipper in der großen Furche der DNA; in grau die DNA-Doppelhelix, in rot das Leucinzippermotiv (PDB: 1YSA).^[53] Rechts: Zinkfingermotiv.^[52]

Der größte Teil der eukaryotischen DNA-bindenden Proteine besitzen Zinkfinger motive. Die Zinkfinger-Struktur besteht aus einem antiparallel verlaufenden β -Faltblatt und einer α -Helix. Die Faltung wird durch die Koordination eines Zn^{2+} -Ions durch die Schwefelatome zweier Cysteinreste und dem Imidazol-Stickstoffatom zweier Histidinreste stabilisiert (siehe Abbildung 13).^[54-56] Die DNA-Erkennung erfolgt durch Bindung der α -Helix in der großen Furche. Zinkfingerproteine besitzen mindestens zwei solcher „Finger“, wobei jede Einheit eine 3-4 Basenpaar lange DNA-Sequenz erkennen kann.^[57, 58]

In Abbildung 14 ist die Kristallstruktur von dem Komplex des Proteins NFAT (Nuclear Factor of activated T cells) und des AP-1 Heterodimers (Fos-Jun, ein Leucinzippermotiv) mit DNA gezeigt.^[59]

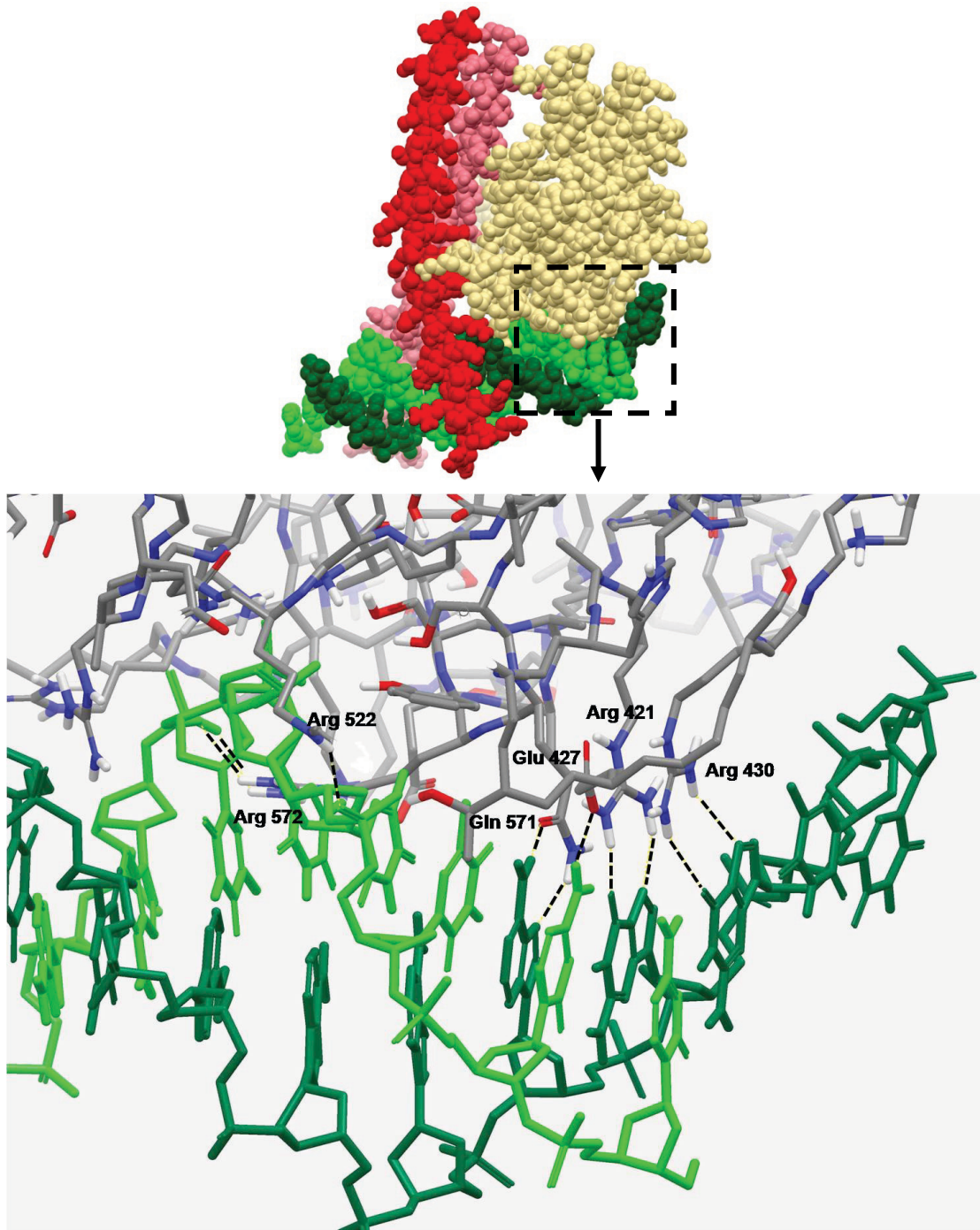


Abbildung 14: DNA-Erkennung des Komplexes NFAT/Fos-Jun in der großen Furche (PDB: 1A02).^[59] Oben: Gesamtansicht; grün: DNA-Stränge; rot: Leucinzippermotiv Fos-Jun; gelb: NFAT-Protein. Unten: Ausschnitt aus einer Erkennungsdomäne der NFAT-Einheit. Die Aminosäuren Arg 430 und Arg 421 erkennen mit ihrer Guanidiniumeinheit jeweils ein Guanin, Glu 427 erkennt Cytosin und Gln 571 Adenin. Die beiden Arginine Arg 522 und Arg 572 gehen Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat ein.

Beide Proteine aktivieren synergistisch die Expression einiger Gene für die Immunantwort. Ein Ausschnitt aus der Bindungsdomäne des NFAT-Proteins (in gelb) in der großen Furche zeigt die Interaktionen einiger Aminosäurereste mit der DNA. Die beiden Arginine Arg 430 und Arg 421 erkennen mit ihren Guanidiniumgruppen die DNA-Base Guanin, indem sie bidentale Wasserstoffbrückenbindungen zu den N7- und O6-Atomen der Base ausbilden. Die Aminosäure Glutamin Gln 571 erkennt mit ihrer Amidfunktion die DNA-Base Adenin über Wasserstoffbrückenbindungen zu den N7- und N6-Atomen. Glutamat Glu 427 erkennt über eine Wasserstoffbrückenbindung zu N4 die Nucleinbase Cytosin. Die beiden Arginine Arg 522 und Arg 572 gehen Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat ein. Durch weitere Wechselwirkungen von NFAT und dem Leucinezippermotiv Fos-Jun mit der DNA kann durch diesen Komplex insgesamt eine Sequenz von 15 Basenpaaren erkannt werden.^[59]

1.6.2 Erkennung durch künstliche Rezeptoren

Der komplexe Ablauf der Protein-DNA-Erkennung macht es fast unmöglich, künstliche Rezeptoren herzustellen, die eine spezifische DNA-Sequenz selektiv erkennen können. Vielversprechend ist der Einsatz synthetischer Peptide mit Zinkfingermotiven.^[60] Die Gruppe um *J. L. Mascareñas* hat DNA-Binder entwickelt, in denen eine Pyrrol-Oligomereinheit über einen Linker mit einem synthetischen Zinkfinger- oder Leucinezippermotiv verknüpft ist. Die Erkennung der DNA-Basen in der großen Furche soll dabei durch die Erkennungshelices der jeweiligen Peptidmotive erfolgen, während das Pyrrololigomer die Aufgabe hat, durch seine starke Bindung an AT-reiche Sequenzen in der kleinen Furche die Bindung des Peptidmotivs an einer spezifischen Stelle der DNA zu begünstigen.^[61-65]

Kürzlich wurde von *M. J. Hannon* ein erster künstlicher nicht-kovalente DNA-Binder vorgestellt, der in der großen Furche bindet. Dabei handelt es sich um einen tetrakationischen supramolekularen Metall-Zylinder mit einer durchschnittlichen Größe von $2 \times 1 \text{ nm}^2$.^[66, 67] Dieses Molekül bindet stark an die große Furche der DNA und induziert eine Biegung mit anschließender intramolekularer Aufwicklung.

1.6.3 Erkennung durch Oligonucleotide

Ein interessanter Ansatz ist die Erkennung von DNA in der großen Furche mit Oligodesoxyribonucleinsäuren, kurz Oligonucleotiden.^[68-70] Oligonucleotide können eine stabile spezifische Triplex bilden, indem ein Nucleinsäurestrang in der großen Furche einer Doppelstrang-DNA bindet. Die Erkennung erfolgt über spezifische Wasserstoffbrückenbindungen zu den Purinnucleinbasen, indem sog. *Hogsteen-Basenpaare* gebildet werden und ist sequenzselektiv. Bei dem Pyrimidin-Motiv erkennt Thymin AT, und protoniertes Cytosin GC, während bei dem Purin-Motiv Adenin an AT bindet, und Guanin an GC (siehe Abbildung 15).^[70-73]

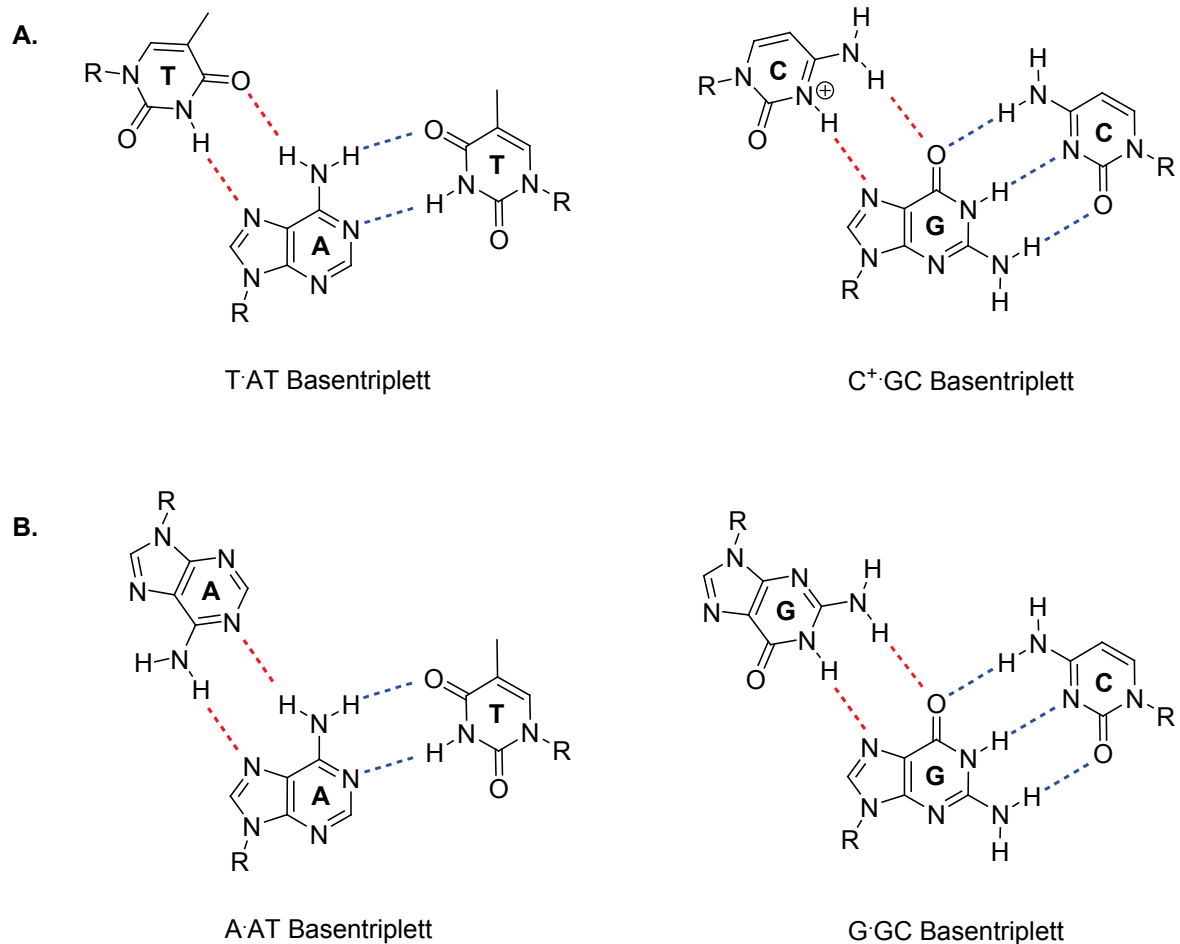


Abbildung 15: *Hogsteen-Basenpaare, A.) Pyrimidin-Motiv, B.) Purin-Motiv.*

Diese Wechselwirkungen können aber nur erfolgen, wenn einer der beiden Doppelstränge aus einer Sequenz von Purinbasen (A oder G) besteht.^[74-78] Die Erkennung über das Pyrimidin-Motiv ist zudem stark pH-abhängig, da die Base Cytosin protoniert vorliegen muss. Darüberhinaus sind die Oligodesoxyribonucleinsäuren nicht selektiv für DNA, sie können auch an RNA-Stränge binden und RNA-DNA-Duplexe bilden. Auch füllt das Oligonucleotid die große Furche nicht so effektiv aus wie Protein-DNA-Erkennungseinheiten. Trotz dieser Einschränkungen wurden Oligodesoxyribonucleinsäuren entwickelt, die in zellfreien Systemen die Genexpression zu regulieren vermögen, indem sie DNA-bindende Proteine inhibieren.^[68, 69]

1.6.4 Erkennung durch Peptidnucleinsäuren

Da die negativen Ladungen eines Oligonucleotides für die Annäherung und Bindung an den DNA-Doppelstrang elektrostatisch ungünstig sind, entwickelte *P. E. Nielsen* die Peptidnucleinsäure (PNA), ein neutrales Oligonucleotid-Analogon, in dem das negativ geladene Zuckerphosphat-Rückgrat durch Polyamide ersetzt ist (Abbildung 16).^[79] Diese PNAs bilden wie die Oligonucleotide eine Triplex mit doppelsträngiger DNA aus. Allerdings wird dabei zunächst einer der beiden DNA-Stränge von einem PNA-Oligomer ersetzt, wobei sich *Watson-Crick*-Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den PNA- und DNA-Basen ausbilden. Durch Bindung eines weiteren PNA-Strangs über *Hogsteen-Basenpaare* in der großen Furche der PNA-DNA-Helix bildet sich eine (DNA)(PNA)₂-Triplex aus.^[80-82]

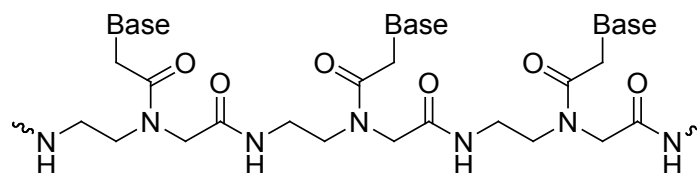


Abbildung 16: Struktur einer Peptidnucleinsäure.

1.7 Calixarene

Calix[n]arene sind cyclische, kelchförmige Kondensationsprodukte aus *para*-substituierten Phenolen und Formaldehyd. In diesen Verbindungen sind also *n* Phenolmoleküle in *ortho*-Stellung zur phenolischen Hydroxygruppe über Methylenbrücken miteinander verknüpft. Das Grundgerüst ist das eines [1_n]-Metacyclophans, bei dem die Hydroxygruppen *endo*-ständig sind.^[83] Der Name Calixaren, 1978 von *C. D. Gutsche* eingeführt, ist dabei abgeleitet von dem griechischen Wort *calix* für Vase oder Kelch, welches sich auf die kelchartige Struktur dieser Moleküle bezieht und dem Wort *aren* als Hinweis auf die aromatischen Bausteine.^[84, 85] Die *endo*-Seite wird als lower rim (unterer Rand) und die *exo*-Seite als upper rim (oberer Rand) bezeichnet. An diesen beiden Stellen findet auch eine Funktionalisierung der Calixarene statt.

Die Geschichte der Calixarene zeichnet sich durch eine unerwartet erfolgreiche Entwicklung aus. Schon im Jahr 1872 wurde erstmalig durch *A. von Baeyer* die Kondensation von Phenol mit Formaldehyd zu einer harzartigen Substanz, deren Struktur damals noch nicht aufgeklärt werden konnte, entdeckt. *L. Baekeland* entwickelte 1907 aus dieser Reaktion den ersten synthetischen Kunststoff, das Bakelite. *A. Zinke* war es dann, der 1944 erstmals durch baseninduzierte Kondensation von *p*-*tert*-Butylphenol und Formaldehyd cyclische tetramere kristalline Substanzen herstellte. *C. D. Gutsche* ist es zu verdanken, dass Calixarene heutzutage durch die Kondensation von *p*-*tert*-Butylphenol mit Formaldehyd unter alkalischen Bedingungen in einem Syntheseschritt zugänglich sind.^[85, 86] Je nach Reaktionsbedingungen (Äquivalente an Base, Reaktionszeit und Temperatur) können Calixarene mit 4, 6 oder 8 *p*-*tert*-Butylphenol-Einheiten erhalten werden.^[83]

Mit Entdeckung der Kronenether (Coronanden), Kryptanden und Spheranden durch *C. J. Pedersen*, *J. M. Lehn* und *D. J. Cram* begann eine Entwicklung in der Chemie, die heutzutage als Wirt-Gast-Chemie bezeichnet wird bzw. unter den Begriff der Supramolekularen Chemie fällt.^[87-95] Seit Prägung des Namens Calixaren durch *C. D. Gutsche* und intensiver Forschung auf diesem Gebiet in den folgenden Jahren, gewannen die Calixarene in ihrer Eigenschaft als supramolekulare Rezeptoren, vor allem durch ihr Vermögen kleinere Moleküle und Ionen durch nichtkovalente Wechselwirkungen in ihrer Kavität einzuschließen, zunehmend an Bedeutung.^[85, 96-98]

Ihre Verwendung ist sehr vielfältig, als ausgewählte Beispiele seien hier ihre Funktion als biomimetische Rezeptoren für bioaktive Gäste^[97], als Ionophore in ionenselektiven Elektroden^[97, 98], als Klebstoffe, als Katalysatoren, als stationäre Phasen in der Chromatographie, als Bausteine für molekulare Kapseln^[99-102], sowie als multivalente Liganden für biologische Prozesse genannt.^[103]

Die Besonderheit der Calixarene und Bedeutung im Hinblick auf ihre supramolekularen Eigenschaften liegt in ihrer räumlichen Struktur begründet. Schon 1955 unterschied *J. W. Cornforth*^[104] vier verschiedene Konformationen von Calix[4]arenen, die später von *C. D Gutsche* als *cone*, *partial cone*, *1,2-alternate* und *1,3-alternate* bezeichnet wurden (siehe Abbildung 17.^[85] Alle Konformere sind durch eine Rotation der Phenolbausteine um die σ -Bindung zwischen dem Benzolring und den Methylengruppen zugänglich. Allerdings liegt das *p*-*tert*-Butylcalix[4]aren immer in der *cone*-Konformation vor, da diese durch einen Ring intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird.^[97, 105]

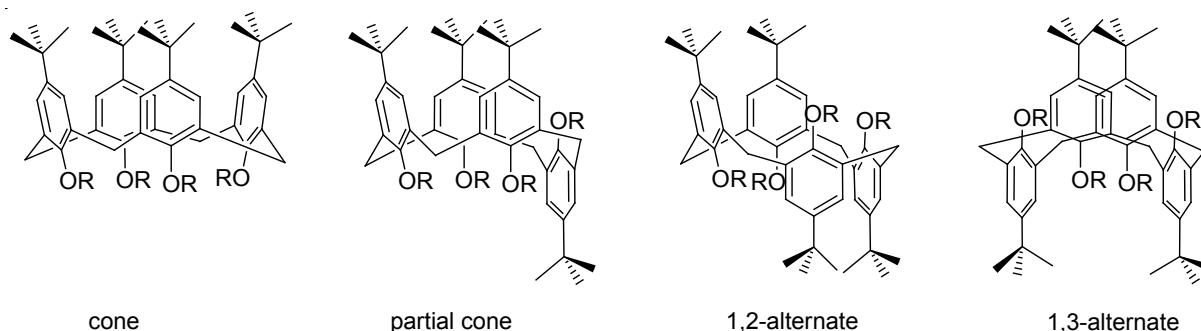


Abbildung 17: Konformationen des Calix[4]arens.

Bei vielen Calix[4]-arenen, die in einer *cone*-Konformation vorliegen, wurde durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt, dass zwei der Arylgruppen fast parallel zueinander stehen, während die anderen Beiden nach außen ausgebreitet sind. Diese Konformation, die statt der C_{4v} -Symmetrie der *cone*-Konformation eine C_{2v} -Symmetrie aufweist, wird auch als *pinched cone* bezeichnet.^[106] Durch die Umsetzung der phenolischen Hydroxygruppen zu Ethern kann die *cone*-Konformation stabilisiert werden, da größere Substituenten (Reste größer als Ethylgruppen) nicht mehr durch den Ring treten können.^[107]

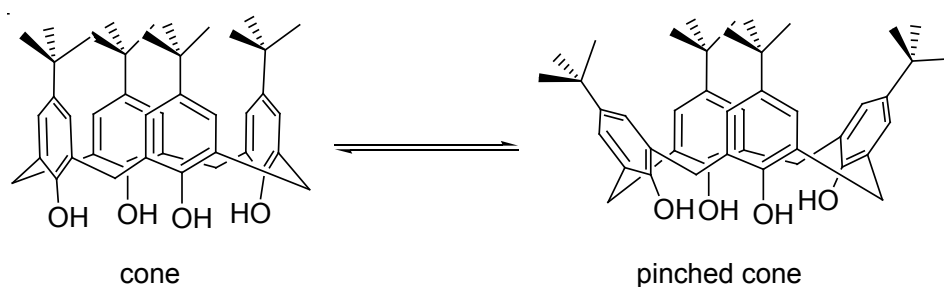


Abbildung 18: Umwandlung der cone- in die pinched cone Konformation.

Dass das *p-tert.*-Butylcalix[4]aren auch in Lösung in der *cone*-Konformation vorliegt, geht eindeutig aus seinem ^1H -NMR-Spektrum hervor. Für die aromatischen Protonen, die OH-Protonen und die *tert.*-Butylprotonen erscheint jeweils nur ein Singulett. Die geminalen Protonen der Methylengruppe zeigen bei Raumtemperatur zwei Dubletts. Durch NOE-Experimente konnte gezeigt werden, dass das Hochfeld-Dublett den äquatorialen Protonen (näher zum aromatischen Ring) und das Tieffeld-Dublett den axialen Protonen (näher zu den Hydroxygruppen) zuzuordnen ist.^[108]

Anhand der NMR-Signale der Methylenprotonen lassen sich neben der *cone*-Konformation auch andere möglichen Konformationen eines Calix[4]arens feststellen. In der *1,3-alternate*-Konformation sind alle Protonen äquivalent (homotop) und zeigen nur ein Singulett im ^1H -NMR-Spektrum. Das *partial cone*-Konformer besitzt hingegen vier Dubletts für die Methylenprotonen, da jeweils zwei der axialen und zwei der äquatorialen Protonen chemisch äquivalent sind.

1.8 Calix[4]aren-Dimere zur DNA-Erkennung

In der Literatur sind bereits verschiedene Methoden zur Synthese von spacerverbrückten Calix[4]arenen beschrieben.^[109-111]

Im Arbeitskreis *Schrader* wurden zwei dimere Calix[4]arene mit sechs Anilingroupen am oberen Rand synthetisiert, in denen zwei Calixareneinheiten über einen Spacer miteinander verknüpft sind. Dabei enthält das Dimer **1** einen aliphatischen, flexiblen Linker, und das Dimer **1a** einen starren, aromatischen Spacer (siehe Abbildung 19). Die sechs Anilingroupen an jedem der beiden Dimere liegen bei neutralem pH-Wert kaum protoniert vor. Mittels pK_a -Titrationen konnte gezeigt werden, dass nur eine Anilingroup an jeder Calixareneinheit bei neutralem pH protoniert vorliegt, was in einer Gesamtladung von +2 in jedem Dimer resultiert.

Die beiden Dimere wurden zunächst auf ihre Eigenschaften als molekulare Kapseln zum Einschluss von negativ geladenen Gästen untersucht.^[100, 112]

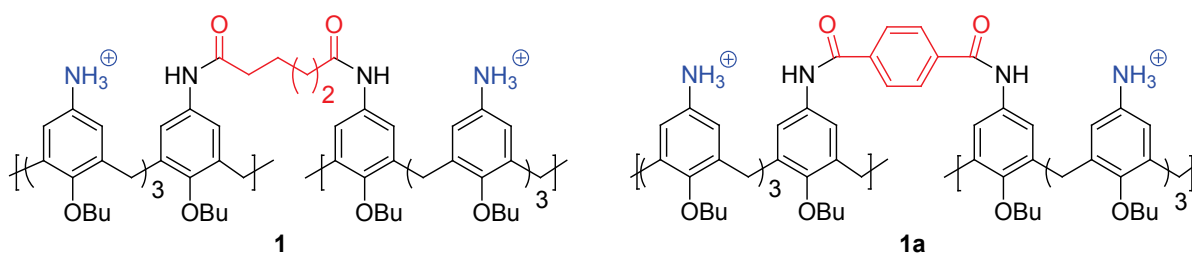


Abbildung 19: Struktur der Dimere **1** und **1a**.

Später wurde durch Fluoreszenztitrationen mit Fluorescein-markierter DNA herausgefunden, dass die dimeren Calix[4]arene sehr stark an Doppelstrang-DNA binden können.^[112] Aufgrund der Wasserunlöslichkeit der beiden Dimere wurden sämtliche Messungen in einem gepufferten Wasser/Methanol-(1:1)-Lösungsmittelgemisch durchgeführt.

Das Dimer **1** weist eine höhere Affinität zu DNA auf, als das Dimer **1a** mit dem aromatischen Spacer. Für den Komplex des Dimers **1** mit DNA-Doppelsträngen wurden Assoziationskonstanten in der Größenordnung von $K_a = 10^5 \text{ M}^{-1}$ erhalten; die bestimmten Werte für das Dimer **1a** waren um zwei Größenordnungen geringer. Durch Moleküldynamiken konnte gezeigt werden, dass sich das durch den aromatischen Spacer sehr starre Dimer **1a** nicht so

gut an die helikal gewundene Struktur der DNA anpassen kann wie das Dimer **1** mit seinem flexiblen Spacer (siehe Abbildung 20).

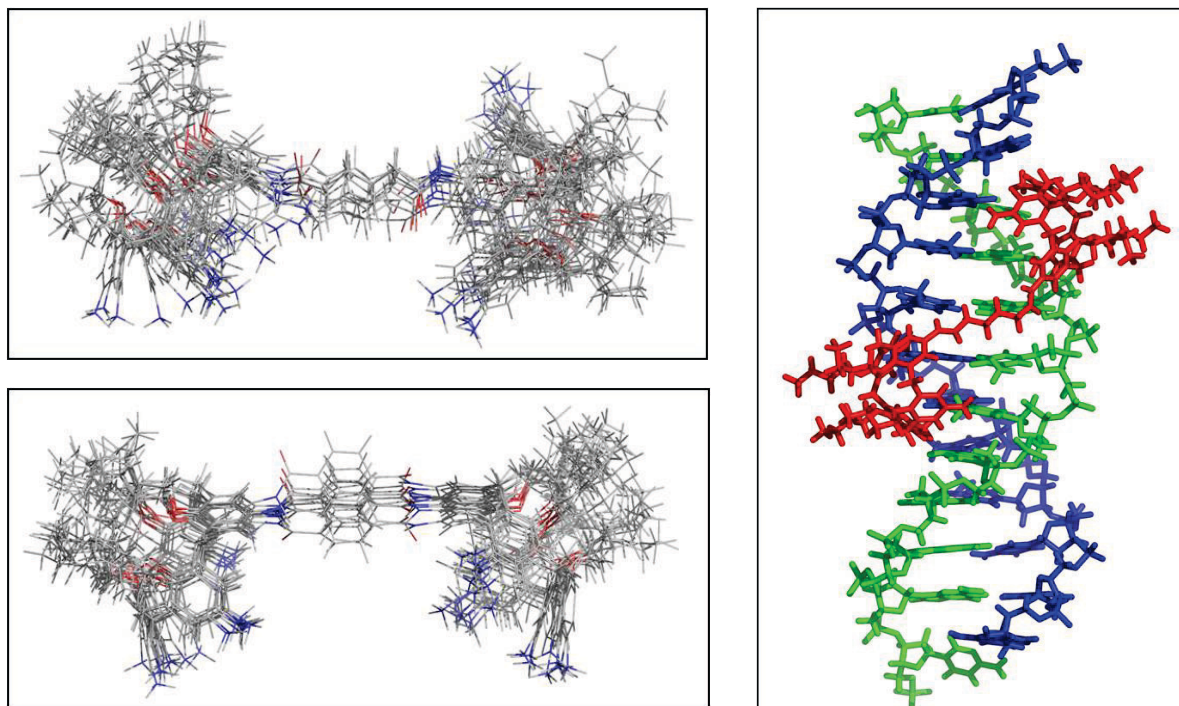


Abbildung 20: Moleküldynamik (MacroModel 7.0, Amber*, Wasser, 10 ps) von Dimer **1** (links oben) und Dimer **1a** (links unten;) und Komplexstruktur von Dimer **1** mit DNA (rechts; DNA-Helix in blau und grün, Dimer in rot; MacroModel 7.0, MMFFs, Wasser, 1000 Schritte).^[112]

Da die Dimere mit einer durchschnittlichen Größe von $3 \times 1 \text{ nm}^2$ eine Dimension besitzen, die eine potentielle Interkalation in die Basenpaare oder Einlagerung in die kleine Furche der DNA weitestgehend ausschließt, wird die Möglichkeit einer Bindung in der großen Furche nahegelegt. Dieser angenommene Bindungsmechanismus wurde durch die Durchführung und Auswertung ausgewählter Experimente (UV-Vis-Schmelzkurven, Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay) bekräftigt.^[112]

Diese neue Klasse von möglichen große-Furche-Bindern hat das Potential DNA-Doppelstränge sequenzselektiv zu erkennen und so einen spezifischen Eingriff in die Genexpression zu erreichen.

2. Aufgabenstellung

Eine Erkennung von DNA in der großen Furche ist, wie schon in der Einleitung erwähnt, von essentieller Bedeutung für die Entwicklung potenter Wirkstoffe, die in die Genexpression eingreifen können.

Im Rahmen dieser Arbeit soll zunächst der Bindungsmodus der DNA-Erkennung durch die Calixaren-Dimere aufgeklärt werden. Durch Modifizierung des Spacers einerseits und der Gruppen am oberen Rand andererseits sollen neue Calixarendimere synthetisiert und mögliche Veränderungen in ihren Bindungseigenschaften mit verschiedenen DNA- und RNA-Molekülen untersucht werden. Durch diese Calixaren-Derivate soll noch keine spezifische Basenpaar-Erkennung fokussiert werden, sondern nur eine Struktur-Aktivitätsbestimmung vorgenommen werden.

In Vorarbeiten von *R. Zadnark* konnte bereits gezeigt werden, dass Calixarendimere mit Anilingruppen am oberen Rand mit hoher Affinität an DNA binden. Durch verschiedene Bindungsstudien konnte eine Interaktion des Dimers mit den Basenpaaren festgestellt werden, was eine Erkennung in der großen Furche der DNA nahelegt. Dabei hat die Spacereinheit einen hohen Einfluss auf die Bindungsstärke, Dimer **1** mit einem flexiblen Spacer bindet um zwei Größenordnungen stärker an Doppelstrang-DNA als das Dimer **1a** mit starrem aromatischem Spacer.

Nach Untersuchung des Prototyps Dimer **1**, welches sehr gute Bindungseigenschaften mit DNA aufweisen konnte, sollen zunächst analoge Anilincalixarendimere mit aliphatischen Spacereinheiten von unterschiedlicher Kettenlänge synthetisiert werden und der Einfluss der veränderten Spacerlänge auf die Bindungseigenschaften mit DNA untersucht werden. Hierzu sollen die Dimere **2-4** mit längeren Ketten (C_6 , C_8 , C_{10}) hergestellt werden (siehe Abbildung 21).

Da in der Erkennungshelix von vielen Transkriptionsfaktoren Seitenketten basischer Aminosäuren die Basenpaare in der großen Furche ablesen und erkennen können, sollen desweiteren Dimere synthetisiert werden, in denen zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen positiv geladenen Gruppen im Spacer und den Nucleinbasen am Grund der großen Furche ausgebildet werden und zu einer Verstärkung des Komplexes beitragen können. Aus diesem

Grund sollen die Calixarendimere **5** und **6** hergestellt werden, welche jeweils zwei positiv geladene Ammoniumgruppen im Spacer enthalten (Abbildung 21).

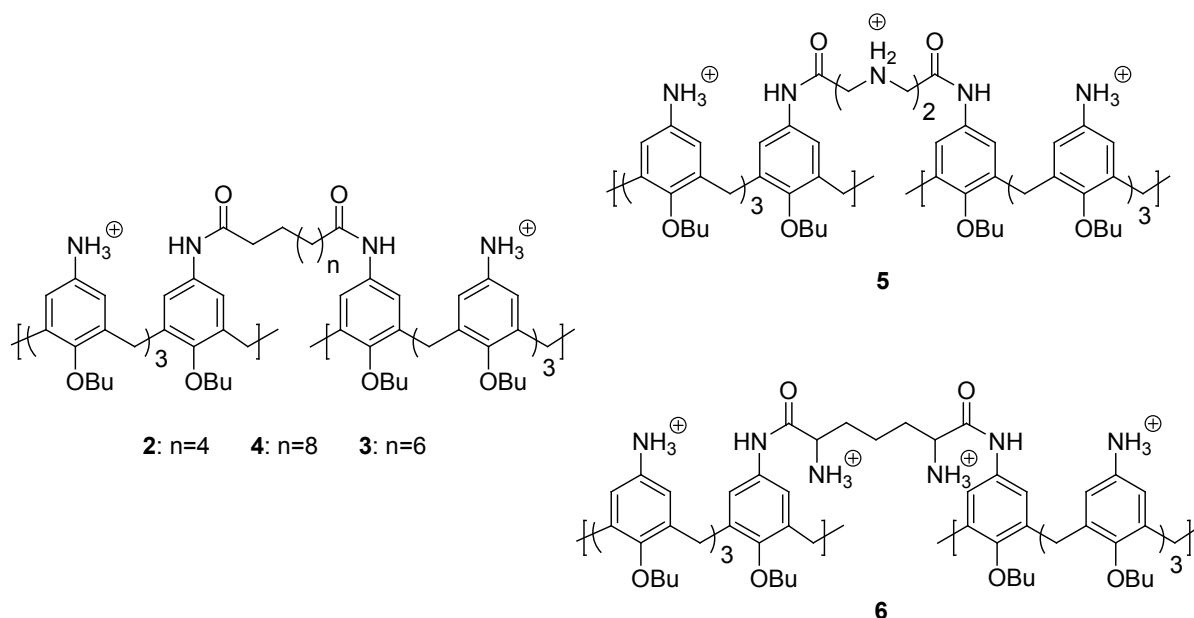


Abbildung 21: Struktur der Dimere 2-6.

In Dimer **5** sollen die Calixareneinheiten über einen Ethylendiamindiessigsäurespacer, bei dem die Ammoniumgruppen direkt in die Alkylkette eingebaut sind, verbunden werden, während die beiden Calixarenhalbschalen in Dimer **6** über einen Diaminopimelinsäurespacer, in dem die Ammoniumgruppen außerhalb der Alkylkette liegen, verbrückt werden sollen. Da die Ammoniumgruppen in Dimer **6** weiter herausragen als in Dimer **5**, sollten sie tiefer in die große Furche hineinragen können, um dort bessere Wechselwirkungen mit den Basenpaaren zu ermöglichen.

Da die Calixarendimere aufgrund ihrer Anilingruppen nur zwei positive Ladungen im Molekül tragen, wäre es interessant zu beobachten, ob sich die DNA-Bindungseigenschaften durch eine Erhöhung der positiven Ladungen im Molekül verbessern lassen und ob der angenommene Bindungsmodus erhalten bleibt. Durch Austausch der Aminogruppen am oberen Rand der Calixareneinheiten durch Guanidiniumgruppen, die bei neutralem pH-Wert durchweg positiv geladen sind, soll das Dimer **7** mit einer sechsfach positiven Ladung hergestellt werden (siehe Abbildung 22). Von *R. Ungaro* konnte bereits gezeigt werden, dass Guanidiniumcalix[4]aren-Monomere stark an DNA binden. Allerdings lösen diese durch

multiple elektrostatische Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat ein intramolekulares DNA-coiling aus, wie durch AFM-Messungen bewiesen werden konnte.^[113]

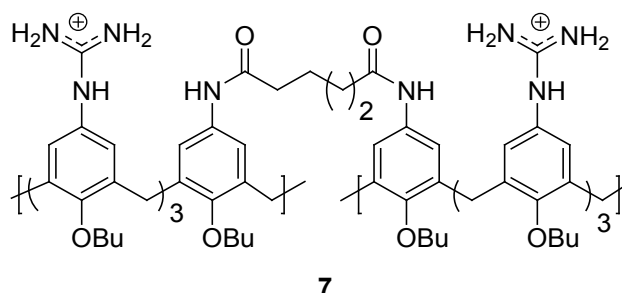


Abbildung 22: Struktur des Dimers 7

In diesem Zusammenhang ist es wichtig, die von den beiden verschiedenen Dimertypen (Anilin- und Guanidiniumcalixarendimere) abgeleiteten monomeren Calixarene auf ihre Bindungseigenschaften mit DNA zu untersuchen und mit den entsprechenden Dimeren zu vergleichen. Dazu sollen die beiden Monomere **M1** (Ammoniumcalix[4]aren) und **M7** (Guanidiniumcalix[4]aren) hergestellt werden (siehe Abbildung 23).

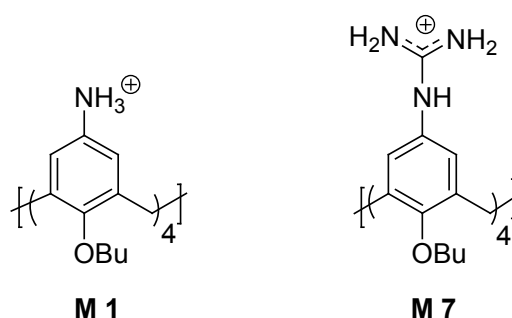


Abbildung 23: Monomere **M1** und **M7**.

Die Komplexbildung von DNA mit diesen Mono- und Dimeren soll durch Fluoreszenztitrationsuntersuchungen untersucht werden und so Assoziationskonstanten K_a bestimmt werden. Desweiteren sollen Ethidiumbromid- und DAPI-Verdrängungs-Assays zur DNA-Affinitätsbestimmung durchgeführt werden. UV-Vis-Schmelzkurven und CD-Spektroskopie können Aufschluss auf den Bindungsmodus geben. Allerdings würde nur eine Kristallstruktur oder eine $^1\text{H-NMR}$ -Struktur des DNA-Dimer-Komplexes einen eindeutigen Beweis für den Bindungsmodus erbringen. Jedoch können durch die oben genannten Experimente erste Hinweise zur Aufklärung erhalten werden, die indirekt Aufschluss über den Bindungsmodus ergeben können.

Um eine Sequenzselektivität in der großen Furche zu erreichen, ist es wichtig, dass der Spacer Wasserstoffbrückenbindungen mit den DNA-Basenpaaren eingehen kann. Neben den Einbau von Aminogruppen in den Spacer (Dimere **5** und **6**), ist der Einsatz von Oligopeptiden mit Heterozykluseinheiten als Linker sehr vielversprechend. Die von den Naturstoffen Netropsin und Distamycin ausgehend entwickelten, aus Heterozyklen bestehenden, Polyamide und Hairpinstrukturen von *P. Dervan* können in der kleinen Furche spezifische DNA-Sequenzen selektiv erkennen. Dabei legen sich diese Oligopeptide durch ihre leicht gebogene Gestalt perfekt an die Krümmung in der kleinen Furche an. Da diese Krümmung in der großen Furche von fast identischer Dimension ist, könnten diese Heterozykleneinheiten auch für die DNA-Erkennung in der großen Furche verwendet werden. Abbildung 24 zeigt die Anordnung eines Tripyrrolpeptids in der kleinen, sowie in der großen Furche.

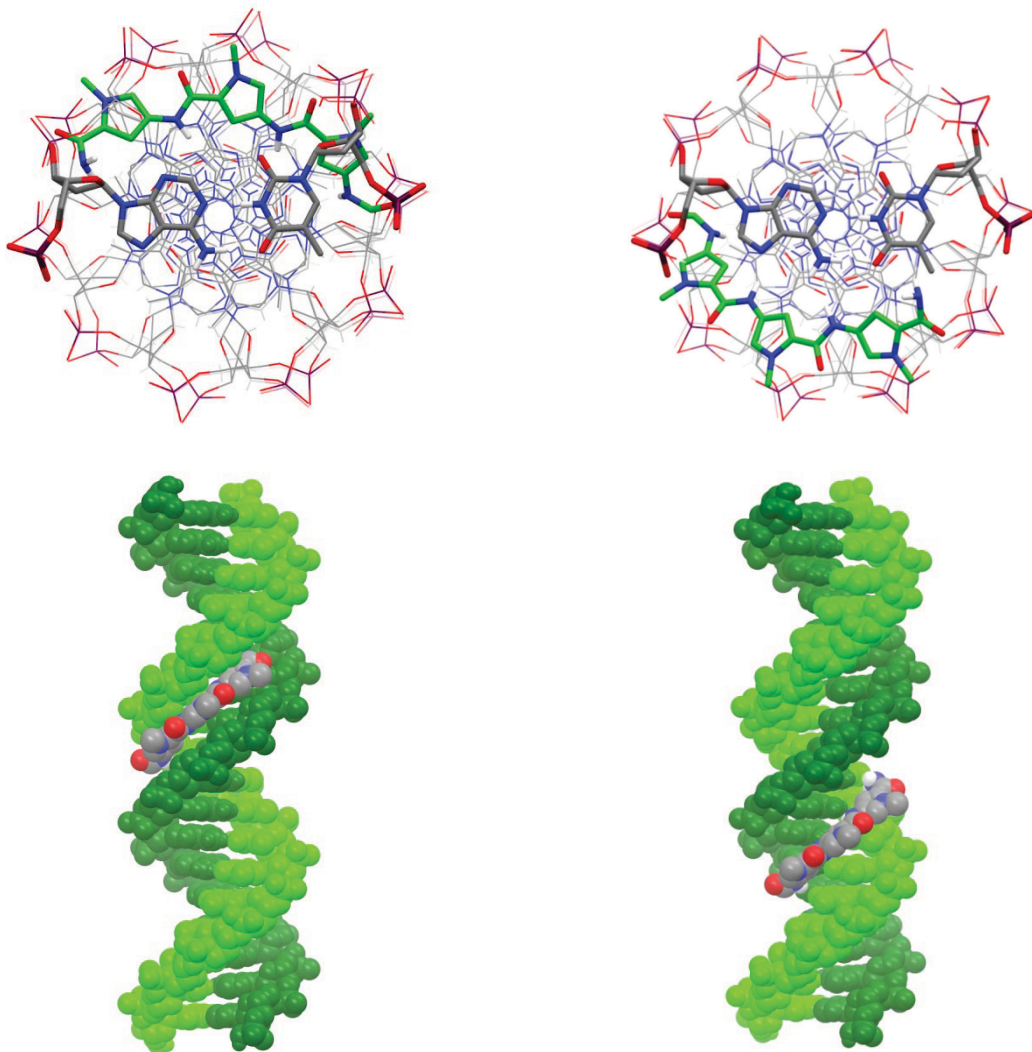


Abbildung 24: Anordnung eines Tripyrrolpeptids in der kleinen Furche (links) und in der großen Furche (rechts). Oben: Ansicht der DNA von oben mit dem Tripyrrolpeptid (grün); erstes Basenpaar hervorgehoben; oberhalb des Basenpaares befindet sich die kleine, unterhalb die große Furche. Unten: Seitenansicht der DNA (grün) mit dem Tripyrrolpeptid (grau).

Während ein Oligopeptidmolekül genau in die kleine Furche der DNA hineinpasst, muss die Furche für die Einlagerung eines Hairpin-Moleküls aufgeweitet werden. Diese erforderliche Aufweitung wäre bei einer Bindung in der großen Furche nicht mehr notwendig.

Von großer Bedeutung wäre es, analog zur kleinen Furche, ein Alphabet in der großen Furche zu etablieren. Die von *P. Dervan* aufgestellte Signatur in der kleinen Furche (siehe Kapitel 1.5) sollte nun auch auf die große Furche übertragen werden. In Abbildung 25 sind die spezifischen Positionen von Wasserstoffbrücken-Donatoren und -Akzeptoren an jedem Watson-Crick-Basenpaar in der großen Furche der DNA dargestellt.

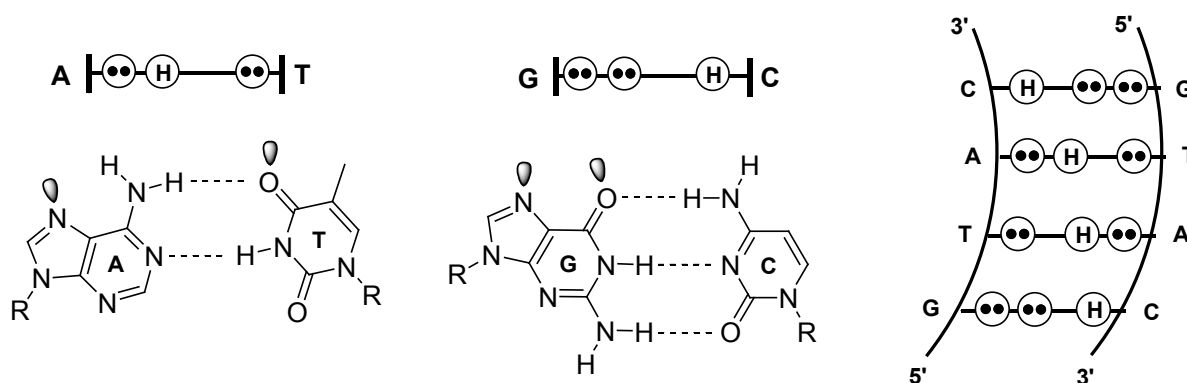


Abbildung 25: Wasserstoffbrücken-Donatoren und -Akzeptoren in der großen Furche der DNA. Kreise mit Punkten repräsentieren die freien Elektronenpaare (Wasserstoffbrücken-Akzeptoren), Kreise mit einem H Wasserstoffatome (Wasserstoffbrücken-Donatoren).

Wegen der ähnlichen Krümmung in der kleinen und großen Furche, sollte ein Tripyrrolpeptid, das mit zwei Calixarenhalbschalen verbunden ist, in der Lage sein, die Basenpaare in der großen Furche ablesen zu können. Dazu soll das in Abbildung 26 schematisch gezeigte Dimer mit einem Tripyrrolspacer hergestellt werden, welches an einer Seite aus synthetischen Gründen einen kurzen aliphatischen Spacer enthält.

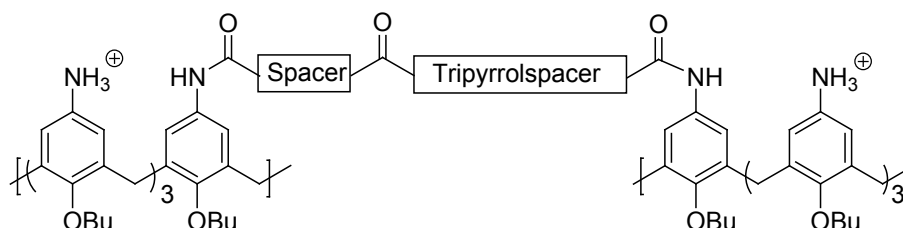


Abbildung 26: Schematische Darstellung eines Calix[4]aren-Dimers mit einem Tripyrrolspacer.

In der kleinen Furche der DNA vermag das Tripyrrolmotiv A·T- bzw. T·A-reiche Sequenzen zu erkennen; diese Eigenschaft lässt sich aber nicht ohne weiteres auf die große Furche übertragen, da hier eine andere Reihenfolge der Wasserstoffbrücken-Donatoren und Wasserstoffbrücken-Akzeptoren vorliegt. Durch Untersuchung der Bindungseigenschaften eines solchen Dimers mit DNA-Doppelsträngen von unterschiedlicher Basensequenz könnte eine bevorzugte DNA-Sequenz herausgestellt werden. Dabei gilt es als Fernziel, eine sequenz-spezifische Erkennung in der großen Furche der DNA zu erreichen.

Da die Calixaren-Dimere nicht wasserlöslich sind, und alle bisherigen Experimente in einem Wasser/Methanol 1:1-Gemisch durchgeführt werden mussten, soll zusätzlich zu den hier vorgestellten Dimeren ein wasserlösliches Calix[4]aren-Dimer mit Polyglycoleinheiten am unteren Rand hergestellt werden (siehe Abbildung 27), um die DNA-Affinität in wässriger gepufferter Lösung untersuchen zu können.

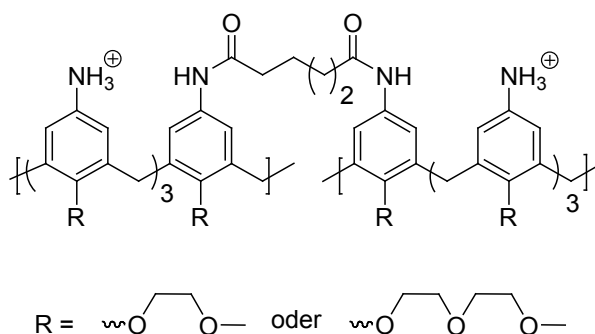


Abbildung 27: Dimere mit Glycoleinheiten am unteren Rand.

3. Durchführung und Ergebnisse

3.1 Methoden

3.1.1 Fluoreszenztitrationen

Die Fluoreszenztitration ist eine empfindliche Messmethode zur Bestimmung von Assoziationskonstanten K_a . Dabei wird die Fluoreszenzintensität eines (fluoreszenzmarkierten) Rezeptors, dessen Konzentration während des gesamten Experiments konstant bleibt, in Abhängigkeit von der Konzentrationserhöhung eines Substrates beobachtet.

Zu Beginn wird die Rezeptorlösung (definiertes Volumen) in einer rührbaren Küvette vorgelegt, ein Fluoreszenzspektrum bei einer definierten Anregungswellenlänge aufgenommen und die Emissionsintensität bei einer definierten Wellenlänge registriert. Während des Experiments werden zu der Rezeptorlösung in der Küvette definierte Volumina der Substratlösung gegeben. Nach jedem Titrationsschritt wird erneut ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen und die Änderung der Emissionsintensität registriert. Die Intensitätsänderung ΔI_{obs} , hervorgerufen durch eine Rezeptor-Substrat-Komplexbildung, steht mit der Assoziationskonstanten K_a durch folgende Gleichung in Abhängigkeit:

$$\Delta I_{\text{obs}} = \frac{\Delta I_{\text{max}}}{[S]_0} \cdot \left(\frac{1}{2} \left([R]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right) - \sqrt{\frac{1}{4} \left([R]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right)^2 - ([R]_0 [S]_0)} \right) \quad 1$$

Zur Bestimmung der Assoziationskonstanten K_a werden die erhaltenen Wertepaare ΔI_{obs} und das Verhältnis der Anfangskonzentrationen von Substrat und Rezeptor (ΔI_{obs} vs. $[S]_0 \cdot [R]_0^{-1}$) nach Gleichung 1 mithilfe des Programmes *SigmaPlot 10.0*^[114] unter Annahme eines 1:1-Komplexes durch eine nicht-lineare Regressionsmethode an die Bindungsisotherme angepasst.^[115]

Die Gibbs'sche Aktivierungsenthalpie steht mit der Assoziationskonstante in folgendem Verhältnis:

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K_a \quad R = 1.978 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \quad 2$$

mit der allgemeinen Gaskonstante R und der Temperatur T.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenztitrationen wurden verschiedene am 5'-Ende fluoresceinmarkierte DNA- und 6-carboxyfluoresceinmarkierte RNA-Doppelstränge von unterschiedlicher Basensequenz verwendet. Die Messungen wurden in 1 mM Hepes-Puffer bei pH 7.1 durchgeführt. Da die hergestellten Dimere und Monomere aufgrund ihrer hydrophoben Butoxygruppen am unteren Rand nicht wasserlöslich sind, mussten alle Titrationen in einem Methanol/ Wasser 1:1-Gemisch untersucht werden.

Durch Bindung der Rezeptoren an die fluoreszenzmarkierten DNA- und RNA-Stränge wurde die Fluoreszenz durchweg nahezu vollständig gequencht. Durch Aufzeichnung der Änderung der Fluoreszenzintensität konnten die Bindungsvorgänge beobachtet und durch Job-Plots die Komplexstöchiometrien ermittelt werden.^[116] Zur Reproduzierbarkeit wurden bei allen Titrationen Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Sequenzen aller für die Fluoreszenztitrationen eingesetzten DNA- und RNA-Stränge sind in den Tabellen 2 und 3 dargestellt.

Tabelle 2: *Verwendete 12 BP DNA- und RNA-Stränge für die Fluoreszenztitrationen.*

Bezeichnung	Sequenz
12 BP [Fl]-DNA	5'-[Fl] GTG ACG AAC CTC -3' / 5'- GAG GTT CGT CAC -3'
12 BP (AT) [Fl]-DNA	5'-[Fl] AAA AAA AAA AAA -3' / 5'- TTT TTT TTT TTT -3'
12 BP (GC) [Fl]-DNA	5'-[Fl] GGG GGG GGG GGG -3' / 5'- CCC CCC CCC CCC -3'
12 BP [6-FAM]-RNA	5'-[6-FAM] AAA AAA AAA AAA -3' / 5'- UUU UUU UUU UUU -3'
12 BP (ATGC) [Fl]-DNA	5'-[Fl] ATG CAT GCA TGC -3' / 5'- GCA TGC ATG CAT -3'
12 BP (AAT) [Fl]-DNA	5'-[Fl] AAT AAT AAT AAT -3' / 5'- ATT ATT ATT ATT -3'
12 BP (AAC) [Fl]-DNA	5'-[Fl] AAC CAA CCA ACC -3' / 5'- GGT TGG TTG GTT -3'

[Fl] = Fluorescein; [6-FAM] = 6-Carboxyfluorescein

Tabelle 3: *Verwendete 20 BP DNA- und RNA-Stränge für die Fluoreszenztitrationen.*

Bezeichnung	Sequenz
20 BP (AT) [Fl]-DNA	5'-[Fl] ATA TAT ATA TAT ATA TAT AT -3' 5'- ATA TAT ATA TAT ATA TAT AT -3'
20 BP (GC) [Fl]-DNA	5'-[Fl] GCG CGC GCG CGC GCG CGC GC -3' 5'- GCG CGC GCG CGC GCG CGC GC -3'
20 BP [6-FAM]-RNA	5'-[6-FAM] AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA -3' 5'- UUU UUU UUU UUU UUU UUU UU -3'

[Fl] = Fluorescein; [6-FAM] = 6-Carboxyfluorescein

3.1.2 Ethidiumbromid- und DAPI-Verdrängungs-Assay

Neben der Verwendung der Fluoreszenztitration zur Untersuchung der DNA-Bindungseigenschaften und Ermittlung der Affinitätskonstante K_a , ist der Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay (engl.: ethidium bromide displacement assay) eine biophysikalische Standardmethode zur Feststellung einer effizienten DNA-Bindung.^[117-119]

Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare von Doppelstrang-DNA ($K_a = 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$). Bei der Ausbildung eines solchen DNA-Komplexes wird die Fluoreszenzintensität des interkalierten Ethidiumbromids im Vergleich zum freien Farbstoff um ein Vielfaches erhöht.^[120]

Durch die sukzessive Zugabe einer stark an die DNA bindenden Substanz wird das interkalierte Ethidiumbromid aus dem DNA-Komplex verdrängt (in Abbildung 28 schematisch dargestellt). Dabei wird die Fluoreszenzintensität gequencht, da das verdrängte Ethidiumbromid nun frei in der Lösung vorliegt. Durch diese Vorgehensweise kann festgestellt werden, wie effizient eine DNA-bindende Substanz den Farbstoff Ethidiumbromid aus dem DNA-Komplex verdrängen kann. Dieses Verdrängungsvermögen korreliert mit der DNA-Affinität der Substanz.

Für jede Ethidiumbromid-Verdrängung werden üblicherweise zwei charakteristische Werte angegeben, C_{50} und CE_{50} , um das Verdrängungsvermögen und dadurch die Affinität zur Doppelstrang-DNA verschiedener Substanzen miteinander zu vergleichen und einzuordnen. Die Substanzkonzentration, bei der die Fluoreszenzintensität um 50% verringert wird, ist als C_{50} definiert. Dabei wird die Fluoreszenzintensität von in die DNA interkaliertem Ethidiumbromid auf 100% gesetzt, und die Intensität von freiem Ethidiumbromid ohne DNA auf 0%. Gemessen wird die prozentuale Abnahme der Fluoreszenz durch die Zugabe der Testsubstanz. Der ermittelte C_{50} -Wert ist indirekt proportional zu der scheinbaren Bindungskonstante K_{app} der untersuchten Substanz. Kleinere C_{50} -Werte weisen somit auf eine höhere DNA-Affinität hin.^[121-123]

Das Ladungsüberschussverhältnis (charge excess) bei 50% Ethidiumbromid-Verdrängung, der CE_{50} -Wert, ist definiert als die Anzahl der positiven Ladungen der DNA-bindenden Substanz dividiert durch die Anzahl der negativen Ladungen der DNA und kann aus dem experimentell ermittelten C_{50} -Wert unter der Annahme, dass jedes Nucleotid eine negative Ladung trägt, wie folgt berechnet werden^[124, 125]:

$$CE_{50} = \frac{C_{50} \cdot \text{Anzahl positive Ladungen}}{[DNA] \cdot \text{Anzahl negative Ladungen}}$$

3

Der CE_{50} -Wert berücksichtigt die Konzentration an Basenpaaren der DNA und gibt Aufschluss über den Ladungsüberschuss im Hinblick auf die DNA-Bindung. Bei einer unspezifischen Bindung erfolgt die DNA-Bindung am Rückgrat durch elektrostatische Wechselwirkungen der positiven Ladungen der Substanz und der negativen Ladungen der DNA-Phosphatgruppen. Je kleiner der CE_{50} -Wert ist, umso weniger ist die Ladung des Rezeptors für die DNA-Bindung ausschlaggebend.

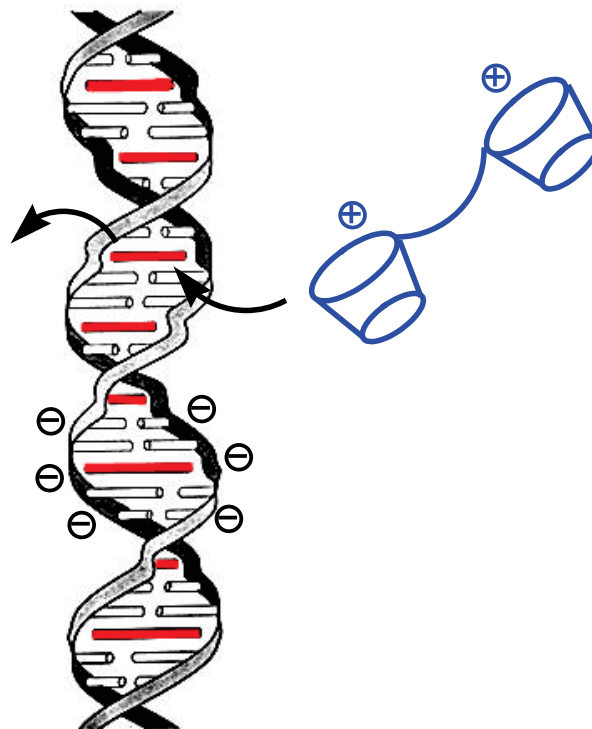


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Verdrängung von in den DNA-Doppelstrang interkaliertem Ethidiumbromid durch ein Calixaren-Dimer; in rot: interkaliertes Ethidiumbromid, in blau: Calixaren-Dimer.

Für die Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assays wurden DNA-Doppelhelices mit 12 und 20 Basenpaaren verwendet. Ihre jeweilige Sequenz ist in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4: *Verwendete DNA-Stränge für den Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay.*

Bezeichnung	Sequenz
12 BP DNA	5'- GTG ACG AAC CTC -3'
	5'- GAG GTT CGT CAC -3'
20 BP DNA	5'- GAG GTT CGT CAC GCA GCT GC -3'
	5'- GCA GCT GCG TGA CGA ACC TC-3'

Eine weitere wichtige Messmethode zur Prüfung, ob eine Bindung in der Furche stattfindet, ist der dem Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay verwandte DAPI-Verdrängungs-Assay^[126]. Hierbei lagert sich das Färbemittel 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in die kleine Furche von AT-reicher Doppelstrang-DNA ein und kann durch Zugabe eines Rezeptors, der in der kleinen oder großen Furche der DNA bindet, (vollständig) verdrängt werden. Wie beim Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay beruht das Messprinzip hier auch auf der Änderung der Fluoreszenzintensität des DAPI-Moleküls. Bei Bindung in der kleinen Furche wird die Fluoreszenzintensität erhöht und durch die Verdrängung des DAPI-Moleküls aus dem DNA-Komplex in die freie Lösung durch eine DNA-bindende Substanz wieder gequencht.

Zur Auswertung werden analog dem Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay ebenfalls die C₅₀- und CE₅₀-Werte für die untersuchten Substanzen ermittelt und können miteinander verglichen werden.

Für den DAPI-Verdrängungs-Assay wurde eine 20 BP (AT) DNA verwendet. Ihre Sequenz ist in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: *Verwendete DNA für den DAPI-Verdrängungs-Assay.*

Bezeichnung	Sequenz
20 BP (AT) DNA	5'- ATA TAT ATA TAT ATA TAT AT -3'
	5'- ATA TAT ATA TAT ATA TAT AT -3'

3.1.3 UV-Vis-Schmelzkurven

Durch thermische Denaturierungsstudien, bzw. der Aufnahme von UV-Vis-Schmelzkurven eines DNA-Komplexes können direkt Schlussfolgerungen zur Stabilität des Komplexes gezogen werden.

Bei dem Vorgang der Hybridisierung werden zwei komplementäre DNA-Einzelstränge zu einem Doppelstrang formiert. Dabei bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren und π - π -Stapelwechselwirkungen aus. Dieser Prozess ist reversibel; der Doppelstrang kann thermisch wieder in die jeweiligen Einzelstränge überführt werden.

Bei Erhöhung der Temperatur einer DNA-Lösung dissoziiert der DNA-Doppelstrang in die beiden Einzelstränge. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren werden aufgebrochen und die Basenstapelung aufgehoben. Dieser Vorgang wird auch als DNA-Schmelzen bezeichnet (Abbildung 29). Die Temperatur, bei der 50% des Doppelstrangs dissoziiert sind, wird als Schmelztemperatur T_m (melting temperature) bezeichnet. Dieser Wert gibt die thermische Stabilität der Doppelstrang-DNA wieder und ist abhängig von der Basenzusammensetzung, der Oligomerlänge und der Salzkonzentration. Da die Basen G und C drei Wasserstoffbrückenbindungen miteinander eingehen, A und T aber nur zwei, erhöht sich die Schmelztemperatur mit steigendem GC-Gehalt.

Das DNA-Schmelzverhalten kann durch die Messung der UV-Absorption der DNA in Abhängigkeit von der Temperatur beobachtet werden. Die Nucleinbasen absorbieren UV-Licht mit einem charakteristischen Absorptionsmaximum bei 260 nm. Bei der thermischen Denaturierung (Schmelzprozess) wird die UV-Absorption erhöht. Dieser Effekt wird als Hyperchromizität bezeichnet und resultiert aus der Auflösung der Basenstapelung. Aufgrund der Basenstapelung besitzt Doppelstrang-DNA einen geringeren molaren Absorptionskoeffizienten als die berechnete Summe der molaren Absorptionskoeffizienten der einzelnen Basen.^[28] Die aus der Auftragung der UV-Absorption bei 260 nm gegen die Temperatur resultierende Schmelzkurve besitzt einen charakteristischen sigmoidalen Verlauf, der auf einen kooperativen Schmelzvorgang hinweist.^[127] Durch das „Aufschmelzen“ einzelner Basenpaare wird das Aufbrechen weiterer benachbarter Basenpaare begünstigt. Der Schmelzpunkt T_m entspricht in der Schmelzkurve dem Wendepunkt und kann aus der 1. Ableitung berechnet werden.

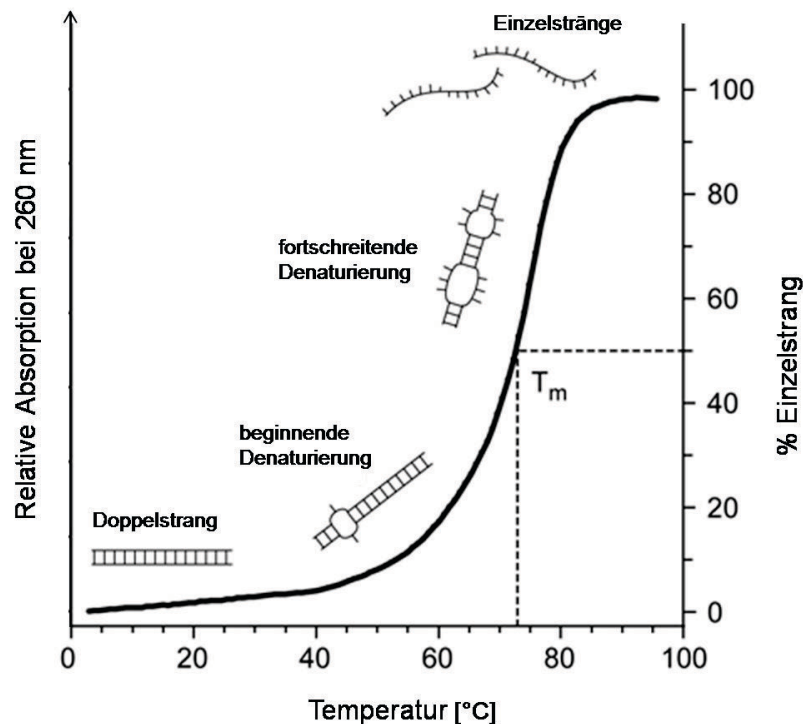


Abbildung 29: DNA-Schmelzkurve.

Durch Bindung einer Substanz an den DNA-Doppelstrang kann die Stabilität der DNA und somit die charakteristische Schmelztemperatur T_m deutlich erhöht werden. Es wird mehr Energie benötigt, um die beiden DNA-Stränge voneinander zu trennen. Der Unterschied zwischen der Schmelztemperatur einer reinen Doppelstrang-DNA T_m° und dem ermittelten Schmelzpunkt T_m in Anwesenheit einer DNA-bindenden Substanz wird als ΔT_m bezeichnet und durch folgenden Zusammenhang berechnet:

$$\Delta T_m = T_m - T_m^\circ \quad 4$$

Der ΔT_m -Wert steht in Beziehung zu der DNA-Bindungsaffinität. Je höher dieser Wert ist, umso stärker ist die Affinität der Substanz zur DNA. Besonders DNA-Interkalatoren und Furche-Binder können die DNA-Doppelhelix stabilisieren, was sich in hohen ΔT_m -Werten widerspiegelt.

In Tabelle 6 sind die Sequenzen der verwendeten DNA- und RNA-Doppelstränge für die thermischen Denaturierungsstudien aufgelistet.

Tabelle 6: *Verwendete DNA- und RNA-Doppelstränge für die thermischen Denaturierungsstudien.*

Bezeichnung	Sequenz
12 BP DNA	5'- GTG ACG AAC CTC -3'
	5'- GAG GTT CGT CAC -3'
20 BP DNA	5'- GAG GTT CGT CAC GCA GCT GC -3'
	5'- GCA GCT GCG TGA CGA ACC TC-3'
20 BP (AT) DNA	5'- ATA TAT ATA TAT ATA TAT AT -3'
	5'- ATA TAT ATA TAT ATA TAT AT -3'
20 BP (GC) DNA	5'- GCG CGC GCG CGC GCG CGC GC -3'
	5'- GCG CGC GCG CGC GCG CGC GC -3'
20 BP RNA	5'- AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA -3'
	5'- UUU UUU UUU UUU UUU UUU UU -3'

3.1.4 Circular-Dichroismus-Spektroskopie

Die Circular-Dichroismus (CD)-Spektroskopie ist eine sehr sensible, chiroptische Methode zur Detektion der absoluten Konfiguration von Molekülen und zur Charakterisierung der Sekundärstruktur von Biomolekülen, wie z.B. Proteinen und Polynucleotiden.

Grundlage dieses Verfahrens ist die unterschiedliche Absorption von links und rechts circularpolarisiertem Licht von einer optisch aktiven Substanz; es gilt $\varepsilon_L \neq \varepsilon_R$. Die Differenz $\Delta\varepsilon$ wird als Circular dichroismus bezeichnet, es gilt in diesem Zusammenhang

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R \neq 0 \quad 5$$

Der Circular dichroismus verursacht einen Effekt, der als Elliptizität bezeichnet wird. Ein circularpolarisierter Lichtstrahl ist dadurch definiert, dass die Spitze des elektrischen Vektors eine Schraubenlinie beschreibt.^[128] Die rechts und links circularpolarisierten Lichtstrahlen bewegen sich aufgrund ihrer unterschiedlich starken Absorption mit verschiedenen Geschwindigkeiten bzw. verschiedenen Wellenlängen ($\lambda_L \neq \lambda_R$) durch die untersuchte Substanz fort, wobei der Summenvektor seine Richtung nicht beibehält, sondern um einen Winkel α gedreht ist und eine Ellipse beschreibt.^[129] Diese wird mathematisch durch den Winkel Θ , der sogenannten Elliptizität bestimmt. Es gilt

$$\Theta = \arctan \frac{b}{a} \quad 6$$

(mit a = Hauptachse, b = Nebenachse der Ellipse).

Aus der spezifischen Elliptizität $[\Theta]$, die wie folgt aus der Elliptizität Θ erhalten wird

$$[\Theta] = \frac{100 \cdot \Theta}{c \cdot d} \quad 7$$

(mit c = Konzentration, d = Schichtdicke)

lässt sich die molare Elliptizität, welche häufig in CD-Spektren angegeben wird, nach der Gleichung

$$[\Theta]_M = \frac{[\Theta] \cdot M}{100} \quad 8$$

berechnen.^[130] Sie ist unter den üblichen Meßbedingungen mit $\Delta\varepsilon$ durch die Formel

$$[\Theta]_M \approx 3300 \cdot \Delta\varepsilon \quad 9$$

verknüpft.^[129] In einem CD-Spektrum ist $\Delta\epsilon$ oder die Elliptizität Θ als Funktion der Wellenlänge aufgetragen.

Ein CD tritt nur auf, wenn die Elektronenanregung durch Licht mit einer Ladungs-Translation (elektrisches Dipolmoment) und einer Ladungs-Rotation (magnetisches Dipolmoment) einhergeht. Das bedeutet, dass nur chirale Chromophore oder achirale Chromophore, in denen das System in chiraler Weise gestört ist (z.B. durch seine Umgebung), ein CD ergeben.^[130]

Die verschiedenen DNA-Strukturfamilien verursachen unterschiedliche CD-Spektren. Aus diesem Grund kann die Analyse durch CD-Spektroskopie wertvolle Informationen über die Sekundärstruktur der DNA-Doppelhelix in Lösung liefern.

Achirale Moleküle geben kein CD-Signal. Wird ein achirales Molekül jedoch in die chirale Umgebung einer Nucleinsäure eingebettet, so findet bei entsprechend starker Bindung an die DNA eine nicht-degenerative Kopplung der Absorptionsübergänge des DNA-Liganden-chromophors und der Nucleinbasen statt, die ein induziertes CD (ICD) im Bereich der Farbstoffabsorption zur Folge hat.^[131] Durch derartige ICD-Signale wird eine nicht-kovalente bindende Wechselwirkung von organischen Verbindungen an die DNA bestätigt.^[132, 133] Das Signal und die Größenordnung der ICD-Bande können unter anderem von der Bindungsgeometrie abhängen. Sowohl die Intensität, als auch die Phase des ICD sind von der Position und der Orientierung des Gastmoleküls relativ zu den Nucleinbasen abhängig.^[134-136] Das tatsächliche Signal und die Größe des induzierten CD-Signals sind kompliziert und hängen von dem Bindungsmodus, der DNA-Sequenz und der Orientierung des Übergangsdipolmoments des Liganden ab.^[131] Es berücksichtigt dabei die Interaktionen des Übergangsmoments der Chromophore mit den Übergangsmomenten der chiral ausgesetzten umgebenden DNA-Basen.^[137]

3.2 Synthese der Dimere 1-7 und der zugehörigen Monomere

3.2.1 Synthese der Anilincalix[4]aren-Dimere 1-6 mit aliphatischen Spacern

Zu Beginn der Arbeit sollten die Calixaren-Dimere **2-4** mit veränderten Spacerkettenlängen, die Dimere **5** und **6** mit Aminofunktionen in der Spacereinheit, sowie das schon bekannte Dimer **1** synthetisiert werden und ihre Bindungseigenschaften gegenüber Doppelstrang-DNA untersucht und verglichen werden.

Ausgehend von *p*-*tert*.-Butylphenol **8** konnten die Dimere nach teilweise bekannten Literaturvorschriften über einen siebenstufigen Syntheseweg erhalten werden. Für die erste Stufe, die Synthese des *p*-*tert*.-Butylcalix[4]arens **9** aus *p*-*tert*.-Butylphenol **8** und Formaldehyd mit NaOH wurde die Originalvorschrift von Gutsche^[86, 138] mit verbesserter Methode nach Biali^[139] verwendet. Um, wie schon erwähnt, das Calix[4]aren in der *cone*-Konformation zu fixieren, wurden die phenolischen Hydroxygruppen am unteren Rand über eine *Williamson'sche Ethersynthese* mit Butylbromid alkyliert.^[140] Für die Funktionalisierung am oberen Rand wurde die *tert*.-Butylgruppe des Butoxycalixarens **10** über eine *ipso*-Nitrierung durch eine Nitrogruppe ausgetauscht und diese im nachfolgenden Schritt durch Hydrierung zur Aminogruppe reduziert, um das Aminocalixaren **12** zu erhalten.^[141]

Da in den Kupplungsreaktionen nur jeweils eine der vier Aminogruppen des Aminocalixarens **12** umgesetzt werden sollte, mussten drei der vier Aminofunktionen mit einer Boc-Schutzgruppe versehen werden.^[101, 142] Dies konnte durch den Einsatz von genau drei Äquivalenten Di-*tert*.-butyldicarbonat (Boc₂O) erreicht werden. Trotzdem wurde bei dieser Reaktion ein Gemisch aus 4-fach, 3-fach und 2-fach-Boc-geschütztem Calixaren als Rohprodukt erhalten, aus dem das gewünschte Produkt **13** durch säulenchromatographische Trennung in hoher Reinheit erhalten werden konnte. In Abbildung 30 ist das Reaktionsschema der Monomersynthese dargestellt.

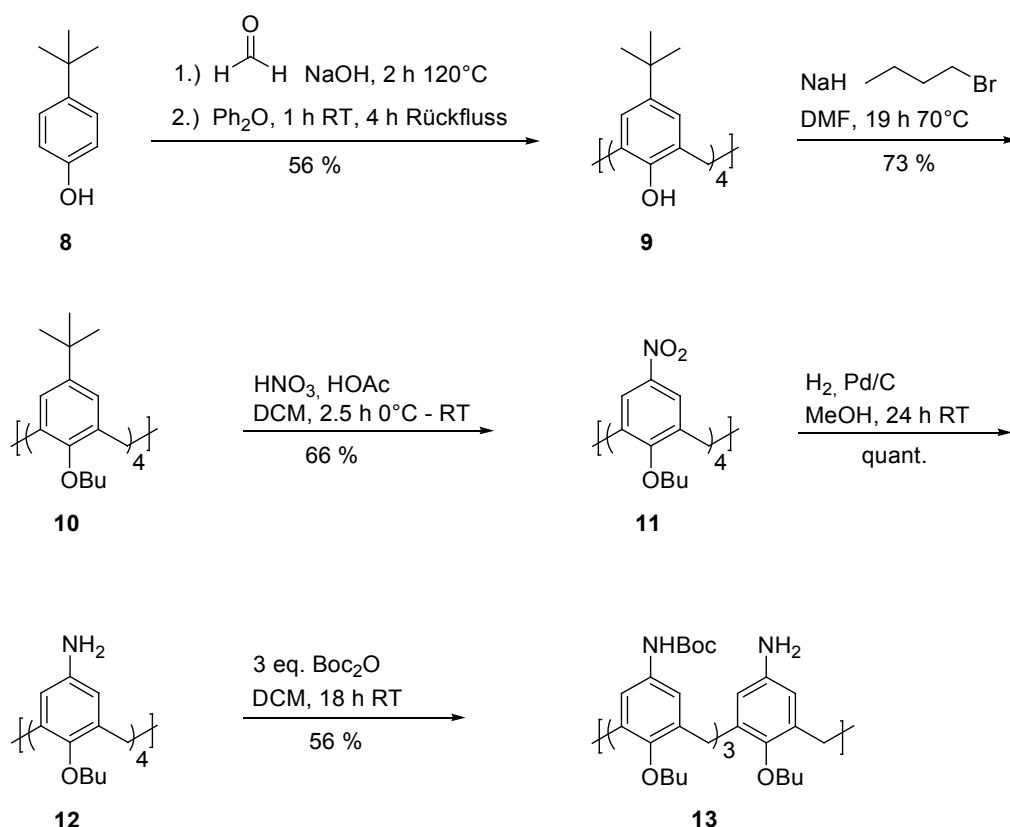


Abbildung 30: Reaktionsschema der Synthese des Calix[4]aren-Monomers **13**.

Die Synthese der Dimere **2** bis **4** konnte über die für Dimer **1** bekannte Vorschrift nach *R. Zadnark* erfolgreich vollzogen werden.^[100, 112] Das Triboc-geschützte Calixaren **13** wurde durch eine doppelte Amidkupplung mit den jeweiligen Disäurechloriden **14-17** unter Verwendung von *Hünig-Base*, mit katalytischem Einsatz von DMAP, zu den entsprechenden Boc-geschützten Dimeren **18** bis **21** umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung und Spaltung der Schutzgruppen unter milden Bedingungen mit TFA wurden das schon bekannte Dimer **1** mit einer zentralen C_4 -Kohlenstoffkette, sowie die Dimere **2-4** mit C_6 -, C_8 - und C_{10} -Kohlenstoffketten erhalten. In Abbildung 31 ist der Syntheseweg kurz dargestellt.

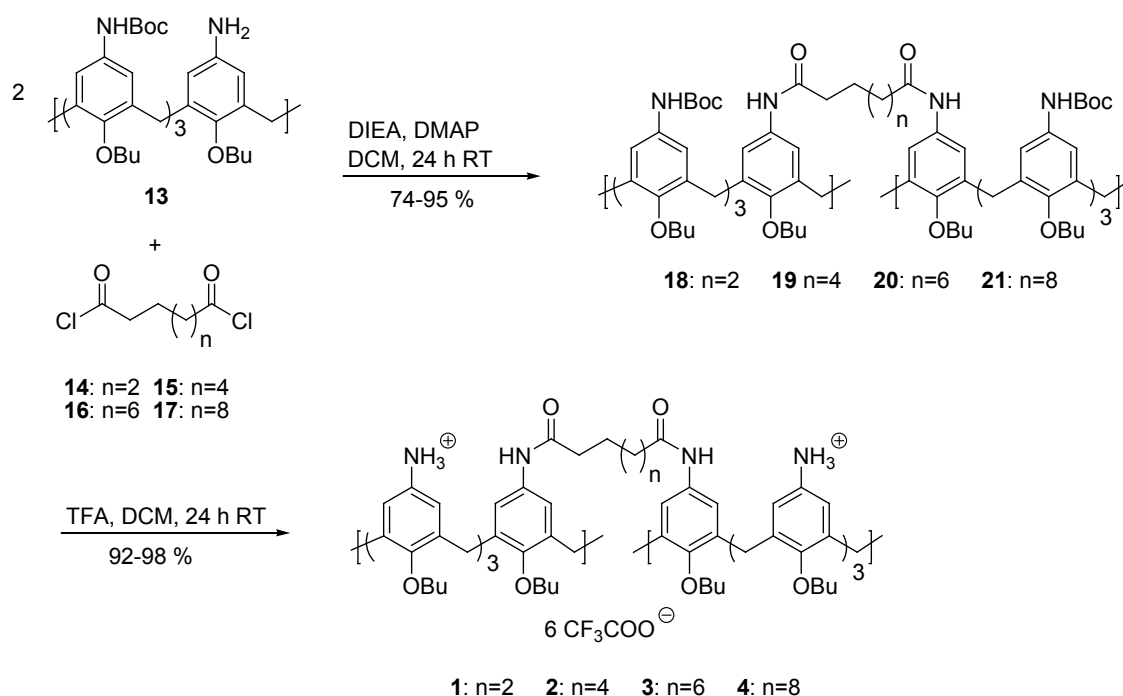


Abbildung 31: Syntheschema der Dimere 1-4.

Die Synthese eines Calixaren-Dimers mit einer kürzeren Seitenkette (C_2) sollte analog der oben beschriebenen Prozedur erfolgen. Hierbei wurde als funktionalisierter Linker Bernsteinsäuredichlorid verwendet. Trotz mehrfacher Kupplungsversuche des Calixarens **13** mit dem Disäuredichlorid konnte das gewünschte Produkt **22** nicht hergestellt werden (Abbildung 32).

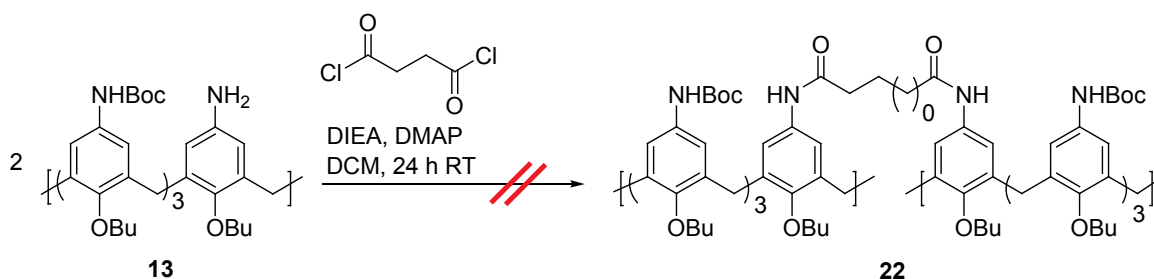


Abbildung 32: Syntheserversuch eines Dimers mit Bernsteinsäurespacer.

Für die Synthese der beiden Dimere **5** und **6** wurden als Spacereinheiten mit internen kationischen Gruppen die beiden Disäuren Ethylendiamin-*N,N'*-diessigsäure **23** und 2,6-Diaminopimelinsäure **24** verwendet. Die beiden freien Aminofunktionen von **23** und **24** wurden zunächst durch Einführung von Boc-Gruppen für die nachfolgende Kupplung geschützt. Die Synthese konnte nach einer allgemeinen Vorschrift zur Boc-Schätzung von Diaminosäuren vollzogen werden (Abbildung 33).^[143]

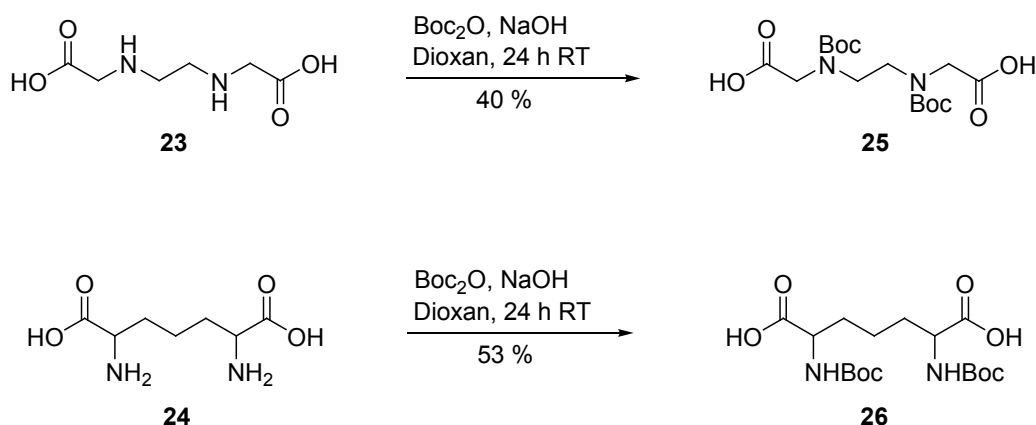


Abbildung 33: Synthese von **25** und **26**.

Zur Herstellung der Dimere **5** und **6** sollte das Calixarenmonomer **13** in einer doppelten Amidkupplung mit den geschützten Diaminosäuren **25** und **26** umgesetzt und anschließend mit TFA entschützt werden. Zunächst wurde für die Kupplung das Mukaiyama-Reagenz mit *Hünig-Base* nach bekannter Vorschrift^[144] eingesetzt. Nach Reinigung konnten allerdings nur moderate Ausbeuten für die geschützten Dimere **27** (40%) und **28** (19%) erzielt werden. Durch Verwendung des Kupplungsreagenzes HCTU, mit Cl-HOBt als Aktivator der Säurefunktionen, konnten die beiden geschützten Dimere **27** und **28** in guten Ausbeuten erhalten werden.^[145, 146] Nach Entschätzung der Calixaren- und Spacer-Boc-Gruppen unter milden Bedingungen mit TFA wurden die Dimere **5** und **6** erhalten (Abbildung 34).

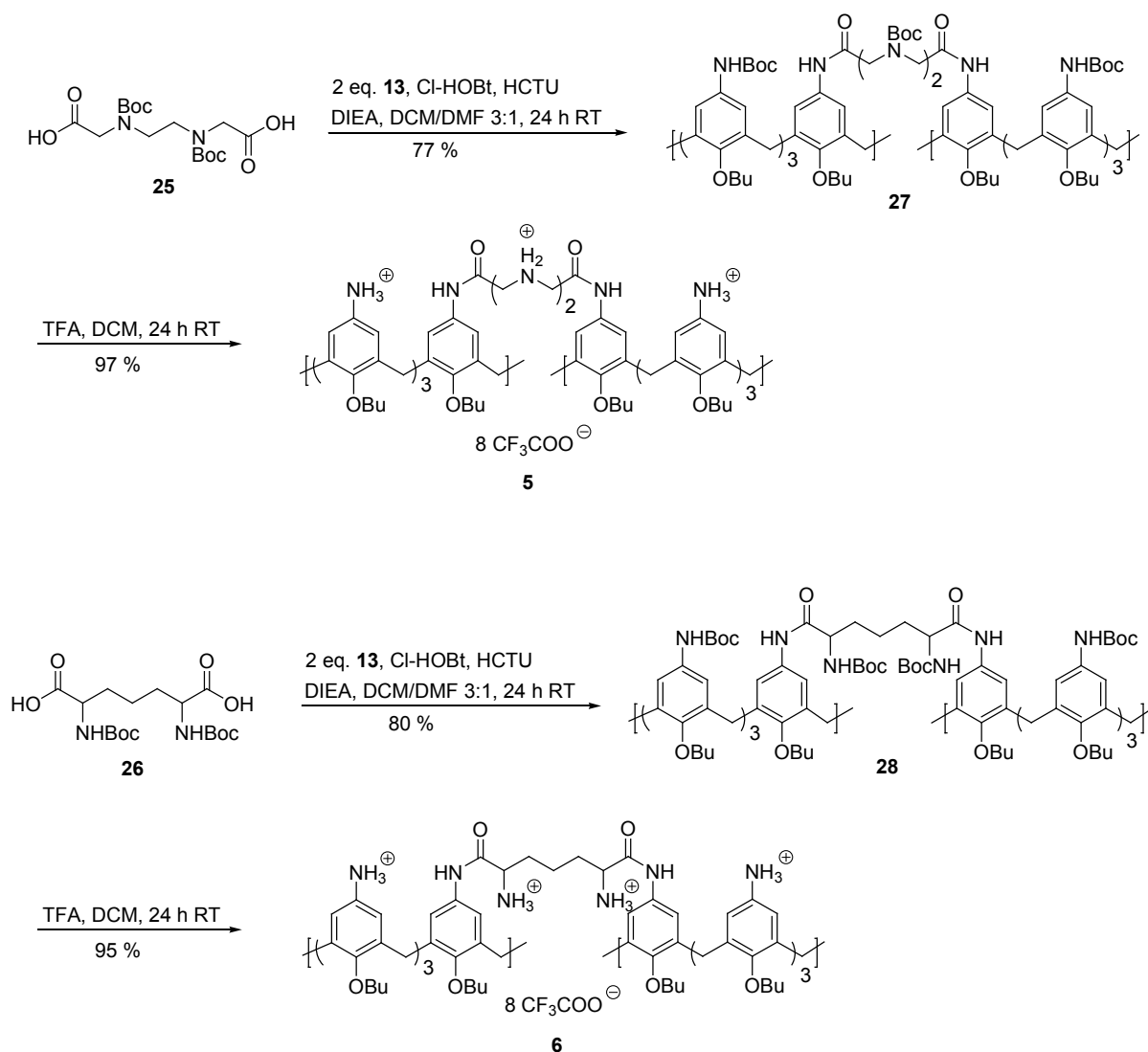


Abbildung 34: Synthese der beiden Dimer 5 und 6.

Mit der Synthese dieser beiden Dimere wurden zusätzlich zu den zwei positiven Ladungen an den beiden Calixareneinheiten zwei weitere positive Ladungen in den jeweiligen Spacer-molekülen eingeführt, was in einer Gesamtladung von +4 bei neutralem pH-Wert resultiert. Durch Untersuchung der Bindungseigenschaften soll aufgedeckt werden, ob und inwieweit die zusätzlichen Ladungen den angenommenen Bindungsmodus und die Bindungsstärke verändern.

3.2.2 Synthese des Guanidiniumcalix[4]aren-Dimers **7**

Zusätzlich zu den bisher dargestellten Anilincalix[4]arenen **1-6**, die bei neutralem pH-Wert jeweils eine positive Ladung pro Calixaren-Halbschale besitzen, sollte ein Calixaren-Dimer hergestellt werden, in dem alle Funktionalitäten am oberen Rand der Calixareneinheiten bei einem pH-Wert von 7 positiv geladen sind und dieses mit dem Dimer **1** hinsichtlich seiner DNA-Bindungseigenschaften verglichen werden. Als Modifikation wurde die gut zugängliche, und bei neutralem pH-Wert stets positiv geladene Guanidiniumgruppe gewählt. Schon *R. Ungaro* stellte eine Reihe von Guanidiniumcalixarenen mit Hexyl-, Propyl- und Methylgruppen am unteren Rand und Kettengrößen von 4, 6 und 8 Areneinheiten dar, von denen einige die Zelltransfektion begünstigen können. Sie bilden mit DNA starke Wechselwirkungen aus, indem sie mit dem Phosphatrückgrat multiple elektrostatische Interaktionen eingehen, und dadurch ein intramolekulares Aufwickeln der DNA (DNA coiling) auslösen.^[113]

In Abbildung 35 ist die Retrosynthese zur Darstellung des Guanidiniumdimers **7** gezeigt. Das Aminocalixaren **12** sollte dreifach mit dem gut zugänglichen *N,N'*-Bis-(*tert.*-butoxycarbonyl)-thioharnstoff^[147] zu dem Monomer **29** umgesetzt werden und anschließend mit Adipinsäuredichlorid zu dem Dimer **30** gekuppelt werden. Nach Abspaltung der Schutzgruppen sollte das Dimer **7** erhalten werden.

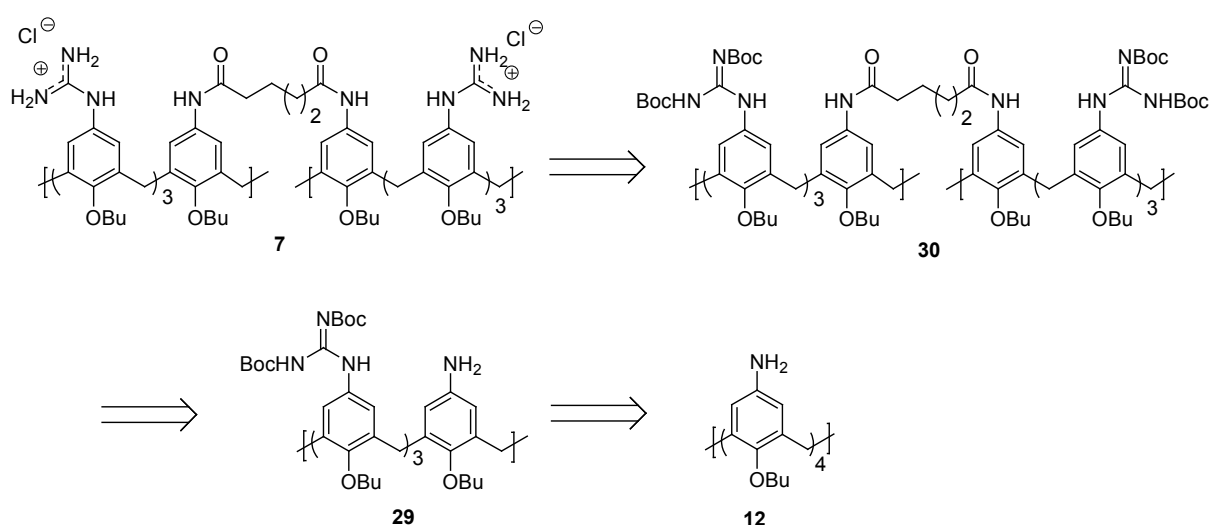


Abbildung 35: Retrosynthesepfad zum Guanidiniumdimer **7**.

Zunächst wurde das Aminocalixaren **12** mit 3 eq. Bis-(Boc)-thioharnstoff und Mukaiyama-Reagenz nach der bekannten *Ungaro*-Vorschrift für vierfach geschützte Guanidinium-calixarenmonomere umgesetzt.^[113] Dabei wurde das dreifach Guanidinium-Boc-geschützte Calixaren **29** als Rohprodukt erhalten. Dieses konnte aber nicht aufgereinigt werden, da das Mukaiyama-Reagenz säulenchromatographisch nicht abgetrennt werden konnte.

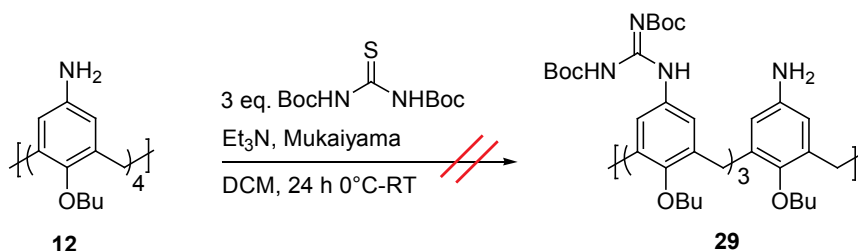
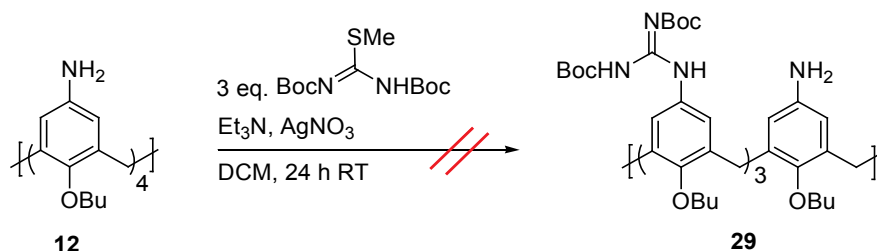


Abbildung 36: Syntheseversuch von **29**.

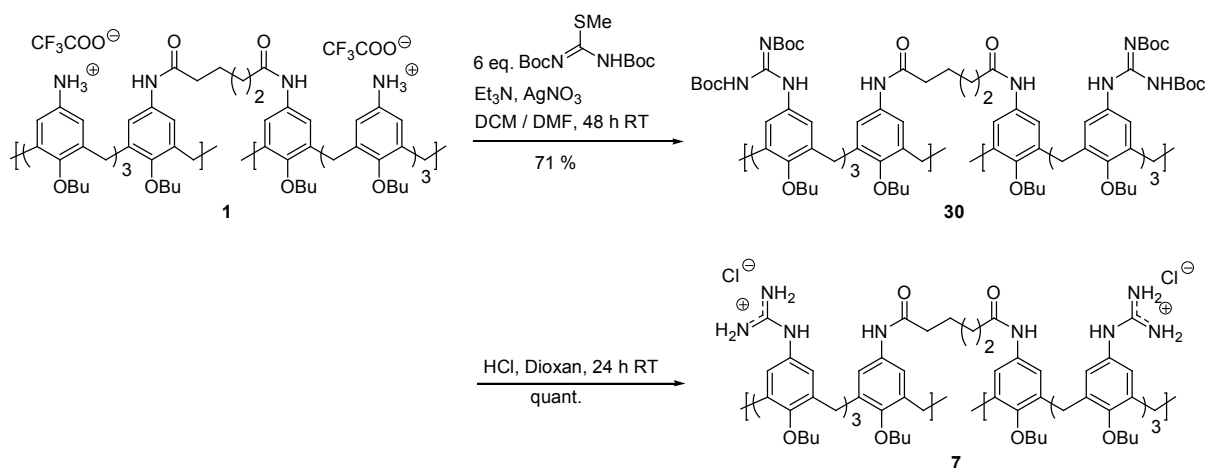
Da das Calixaren **12** durch das Mukaiyama-Reagenz zwar erfolgreich zu dem Guanidiniummonomer **29** umgesetzt werden konnte, das Kupplungsreagenz jedoch nicht mehr aus dem Rohprodukt entfernt werden konnte, wurde ein neuer Syntheseweg zur Herstellung von **29** gewählt.

Eine ebenfalls von der Gruppe *Ungaro* für die Synthese der Guanidiniummonomere verwendete Darstellung ist die Umsetzung des Aminocalixarens **12** mit Bis-(Boc)-thioharnstoff und Quecksilber(II)chlorid.^[113] Die Synthese konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden, da der bei der Reaktion entstandene Niederschlag sehr fein war und nicht abgetrennt werden konnte, weder durch Filtration, noch durch Zentrifugation. Aufgrund dieser schlechten Handhabbarkeit und der Toxizität von Quecksilber(II)chlorid wurde eine weitere Syntheseroute ausprobiert.

Das Aminocalixaren **12** wurde mit *N,N'*-Bis-(*tert*.-butoxycarbonyl)-2-methyl-2-thiopseudothioharnstoff und Silbernitrat, nach einer modifizierten Methode von *Bergeron*^[148], umgesetzt.^[149] Bei dieser Reaktion konnte allerdings nur das Tetra-Boc-geschützte Calixaren erhalten werden.

Abbildung 37: Syntheseversuch von **29**.

Da das dreifach Guanidin-Boc funktionalisierte Calixaren **29** durch die oben beschriebenen Wege nicht zugänglich war, wurde das Calixaren-Dimer **1** direkt zu dem Guanidiniumdimer **30** umgesetzt. Da durch den Einsatz des Harnstoffderivats Bis-(Boc)-methylthiopseudoharnstoff und Silbernitrat das vierfach funktionalisierte Calixaren sehr gut zugänglich war, wurde dieses Syntheseprotokoll für die Herstellung des Dimers **30** verwendet. Nach Reinigung konnte das geschützte Dimer **30** in guter Ausbeute erhalten werden und durch Entschützung mit HCl quantitativ zu dem Dimer **7** umgesetzt werden (Abbildung 38).

Abbildung 38: Syntheschema für den erfolgreichen Umsatz zum Dimer **7**.

3.2.3 Synthese der Calix[4]aren-Monomere M1 und M7

Nachdem die Dimere **1** bis **7** erfolgreich synthetisiert werden konnten, sollten auch die beiden Monomere **M1**, analog dem Dimer **1**, und **M7**, analog dem Dimer **7**, hergestellt werden, um ihre Rezeptoreigenschaften mit denen der Dimere zu vergleichen. Das Monomer **1** konnte durch Zugabe von HCl in DCM nach bekannter Vorschrift durch Ausfällen erhalten werden (Abbildung 39).^[102]

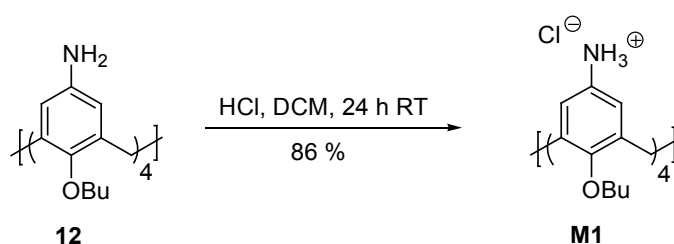


Abbildung 39: Synthese des Monomers **M1**.

Das Guanidinium-Monomer **M7** konnte durch den in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Syntheseweg mit Bis-(Boc)-methyl-thiopseudoharnstoff und Silbernitrat nach Entschützung mit HCl in sehr guter Ausbeute dargestellt werden (siehe Abbildung 40).^[150]

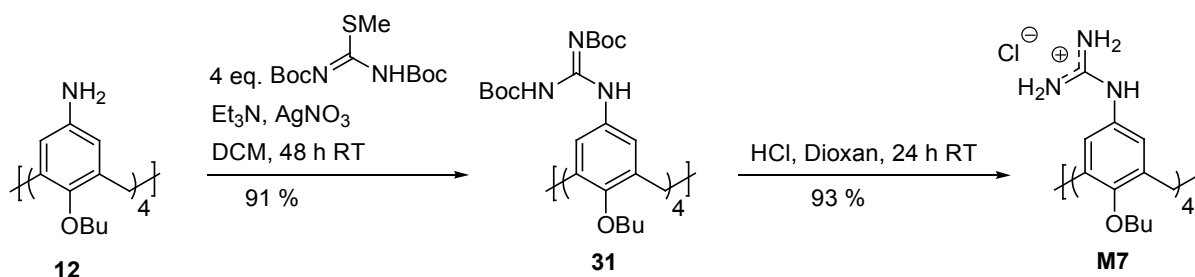


Abbildung 40: Synthese des Guanidinium-Monomers **M7**.

3.3 Bindungsstudien der Dimere 1-7 und Monomere M1 und M7

3.3.1 Fluoreszenztitrationsen

3.3.1.1 Fluoreszenztitrationsen der Dimere 1-6 mit 12 BP [Fl]-DNA- und [6-FAM]-RNA-Doppelsträngen

Für die Ermittlung von Assoziationskonstanten wurden Fluoreszenztitrationsen der Dimere **1-6** mit fluoreszenzmarkierter 12 BP [Fl]-DNA, 12 BP (AT) [Fl]-DNA, 12 BP (GC) [Fl]-DNA und 12 BP [6-FAM]-RNA durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob die Spacerlänge einen Einfluss auf die Bindungsstärke hat und ob spezielle DNA-Sequenzen bevorzugt gebunden werden.

Trotz ihrer erhöhten Lipophilie konnten die Dimere **2-4** in wässrigem Hepes-Puffer mit 50% Methanol-Anteil gelöst werden. Die sechs Anilingruppen der Dimere liegen bei neutralem pH-Wert kaum protoniert vor, wie durch pK_a -Titrationsen gezeigt werden konnte.^[112] Nur eine Anilingruppe an jeder Calixareneinheit ist protoniert, was in einer Ladung der Dimere von insgesamt +2 resultiert. Von den Dimeren **5** und **6** wurde erwartet, dass sie durch die beiden Aminogruppen im Spacer und ihre zwei zusätzlichen positiven Ladungen besser mit den DNA-Basenpaaren wechselwirken, was sich in den Bindungsstudien widerspiegeln sollte. Diese zusätzlichen Ladungen reichten jedoch nicht aus, um das ganze Calixaren-Dimer wasserlöslich zu machen. Deswegen mussten weiterhin alle DNA-Bindungsexperimente in Hepes-Puffer mit Wasser/ Methanol 1:1 als Lösungsmittel durchgeführt werden. Die untersuchten Dimere weisen keine Eigenfluoreszenz auf.

In allen Fällen wurde die Fluoreszenzintensität der fluoreszierenden DNA durch Zugabe des Rezeptors während des Titrationsprozesses vollständig gequencht, was auf eine starke Interaktion der DNA mit den Calixarenen hinweist.

Typisch aufgenommene Fluoreszenzspektren und die dazugehörige Bindungsisotherme einer Titration des Dimers **6** gegen 12 BP [Fl]-DNA sind in Abbildung 41 dargestellt.

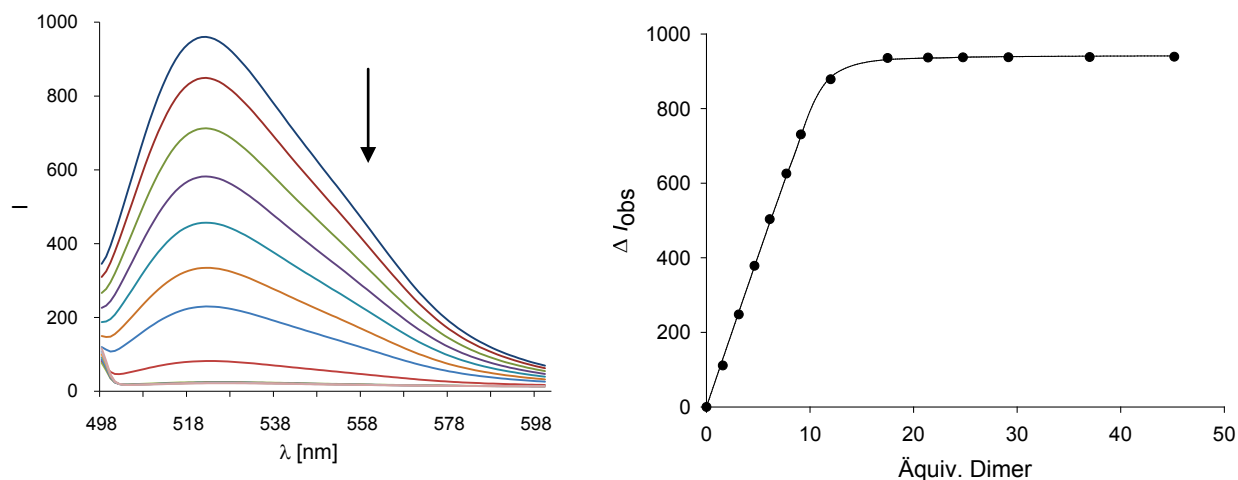


Abbildung 41: Aufgenommene Fluoreszenzspektren (links) und Bindungsisotherme (rechts) für die Titration des Dimers 6 gegen 12 BP [Fl]-DNA.

Der dazugehörige Job Plot aus der Titration zur Bestimmung der Komplexstöchiometrie ist in Abbildung 42 dargestellt. Die Bestimmung der Assoziationskonstanten erfolgte unter Annahme eines 1:1-Komplexes. Hierzu wurde die DNA-Konzentration mit einem Korrekturfaktor multipliziert, bis der Job Plot ein Maximum bei 0.5 und somit eine 1:1-Stöchiometrie zeigte.

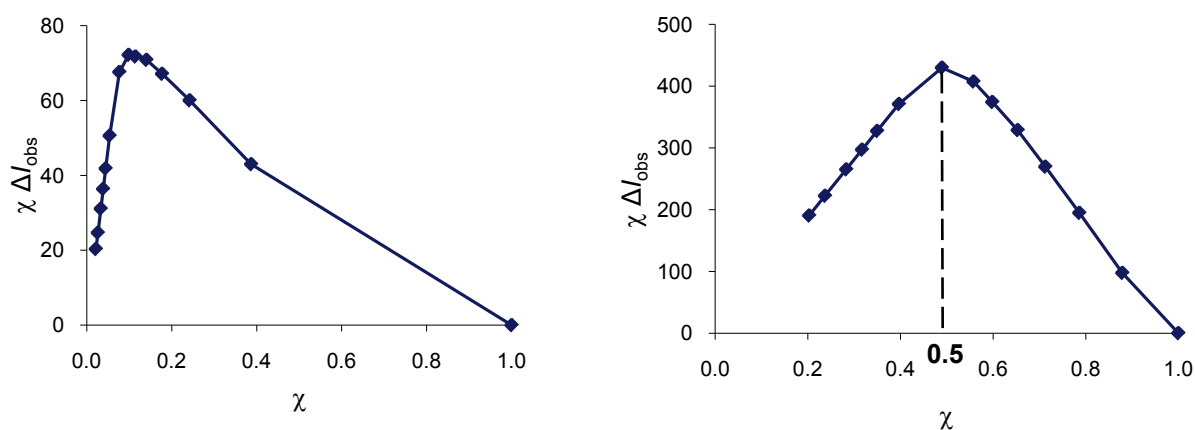


Abbildung 42: Ermittelter Job-Plot aus der Titration von 6 gegen 12 BP [Fl]-DNA (links) und Job-Plot mit simulierter 1:1-Komplexstöchiometrie zur Bestimmung der Assoziationskonstante (rechts).

Durch die Auswertung der Job Plots wurden relativ große Stöchiometrie-Verhältnisse für die untersuchten Komponenten erhalten, was auf eine mögliche Selbstaggregation der Dimere vor oder während der Einlagerung in die große Furche bzw. Bindung an die DNA hinweist.

Aus den erhaltenen Werten für die Bindungskonstanten mit 12 BP [Fl]-DNA (siehe Tabelle 7) wird ersichtlich, dass die Verlängerung der Alkylketten im Spacer der Dimere von C₄ nach C₁₀ keine Verringerung ihrer Affinität zu DNA zur Folge hat. Die Werte für die korrespondierenden Assoziationskonstanten der Dimere **2-4** sind, wie für das Dimer **1**, in der Größenordnung von $K_a = 10^5 \text{ M}^{-1}$, mit keinerlei Tendenz zu einer besseren oder schlechteren Bindung. Interessanterweise lässt sich feststellen, dass die Komplexstöchiometrien mit Erweiterung der Kettenlänge zunimmt. Dies weist auf eine verstärkte Selbstaggregation der Dimere hin. Festgehalten werden kann, dass die Verlängerung der Spacerkettenlänge keinen Affinitäts-Abfall zur Folge hat, und somit generell eine Entwicklung von längeren Spacern befürwortet werden kann. Auch kann anhand dieser Ergebnisse angenommen werden, dass die Dimere **1-4** einen ähnlichen Bindungsmodus mit DNA besitzen.

Die Dimere **5** und **6** zeigen eine größere DNA-Affinität. Dieser Effekt liegt in den zusätzlich vorhandenen Ammoniumgruppen und somit positiven Ladungen in den jeweiligen Spacer-einheiten begründet. Der Affinitäts-Anstieg der Dimere **5** und **6** ist trotz ihrer beiden zusätzlichen positiven Ladungen nicht übermäßig groß, aber für Dimer **6** um eine Größenordnung höher als für die Dimere mit Alkylspacern. Dabei besitzt das Dimer **6** mit dem Diaminopimelinsäurespacer für alle untersuchten DNA-Stränge im Vergleich zu den anderen Dimeren die jeweils höchste Bindungskonstante (für 12 BP DNA: $K_a = 6.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, $\Delta G = -9.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Die höheren K_a -Werte und kleineren Komplexstöchiometrien des Dimers **6** weisen auf zusätzliche Interaktionen durch die Spacereinheit mit der DNA hin. Die Ammoniumgruppen im Dimer **6** ragen aus dem Spacer heraus und können dadurch besser und tiefer in die große Furche der DNA eintauchen, um dort zusätzliche Wechselwirkungen mit den DNA-Basen einzugehen.

Die erhaltenen Assoziationskonstanten K_a , Komplexstöchiometrien, der $\log K_a$ und die freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpie ΔG für die Dimere **1-6** mit den verschiedenen DNA-Strängen sind in den Tabellen 7 und 8 auf der nächsten Seite zusammengefasst.

Tabelle 7: Assoziationskonstanten $K_a [M^{-1}]$, Komplexstöchiometrien, $\log K_a$ und freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpien $\Delta G [kcal \cdot mol^{-1}]$ für die Komplexe der Dimere **1-6** mit 12 BP [Fl]-DNA und 12 BP (GC) [Fl]-DNA.

12 BP [Fl]-DNA					12 BP (GC) [Fl]-DNA			
	$K_a [M^{-1}]$	Stöch.	$\log K_a$	$\Delta G [kcal \cdot mol^{-1}]$	$K_a [M^{-1}]$	Stöch.	$\log K_a$	$\Delta G [kcal \cdot mol^{-1}]$
1	$8.0 \cdot 10^5$ ($\pm 23\%$)	18:1	5.9	-8.0	$5.9 \cdot 10^5$ ($\pm 17\%$)	14:1	5.8	-7.8
2	$7.2 \cdot 10^5$ ($\pm 24\%$)	24:1	5.9	-7.9	$2.4 \cdot 10^5$ ($\pm 16\%$)	13:1	5.4	-7.3
3	$8.2 \cdot 10^5$ ($\pm 24\%$)	18:1	5.9	-8.0	$1.3 \cdot 10^5$ ($\pm 28\%$)	17:1	5.1	-6.9
4	$9.1 \cdot 10^5$ ($\pm 22\%$)	21:1	6.0	-8.1	$8.4 \cdot 10^5$ ($\pm 26\%$)	18:1	5.9	-8.0
5	$1.9 \cdot 10^6$ ($\pm 22\%$)	18:1	6.3	-8.5	$5.1 \cdot 10^5$ ($\pm 26\%$)	14:1	5.7	-7.7
6	$6.2 \cdot 10^6$ ($\pm 22\%$)	12:1	6.8	-9.5	$1.0 \cdot 10^6$ ($\pm 29\%$)	11:1	6.0	-8.1

Stöchiometrie angegeben als [Rezeptor] : [DNA]

Tabelle 8: Assoziationskonstanten $K_a [M^{-1}]$, Komplexstöchiometrien, $\log K_a$ und freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpien $\Delta G [kcal \cdot mol^{-1}]$ für die Komplexe der Dimere **1-6** mit 12 BP (AT) [Fl]-DNA und 12 BP [6-FAM]-RNA.

12 BP (AT) [Fl]-DNA					12 BP [6-FAM]-RNA			
	$K_a [M^{-1}]$	Stöch.	$\log K_a$	$\Delta G [kcal \cdot mol^{-1}]$	$K_a [M^{-1}]$	Stöch.	$\log K_a$	$\Delta G [kcal \cdot mol^{-1}]$
1	$3.6 \cdot 10^5$ ($\pm 20\%$)	22:1	5.6	-7.5	$9.9 \cdot 10^4$ ($\pm 17\%$)	17:1	5.0	-6.8
2	$2.0 \cdot 10^5$ ($\pm 19\%$)	25:1	5.3	-7.2	$1.0 \cdot 10^5$ ($\pm 19\%$)	20:1	5.0	-6.8
3	$6.3 \cdot 10^5$ ($\pm 13\%$)	19:1	5.8	-7.9	$4.8 \cdot 10^5$ ($\pm 17\%$)	16:1	5.7	-7.7
4	$4.8 \cdot 10^5$ ($\pm 24\%$)	25:1	5.7	-7.7	$1.8 \cdot 10^5$ ($\pm 14\%$)	20:1	5.3	-7.1
5	$9.3 \cdot 10^5$ ($\pm 26\%$)	19:1	6.0	-8.1	$3.1 \cdot 10^5$ ($\pm 23\%$)	17:1	5.5	-7.5
6	$1.9 \cdot 10^6$ ($\pm 20\%$)	13:1	6.3	-8.5	$1.9 \cdot 10^6$ ($\pm 23\%$)	15:1	6.3	-8.5

Stöchiometrie angegeben als [Rezeptor] : [DNA]

3.3.1.2 Fluoreszenztitrationsen der Dimere **1**, **7** und Monomere **M1** und **M7** mit 12 BP [Fl]-DNA Strängen

Durch Titrationsexperimente mit dem Dimer **7** und 12 BP [Fl]-DNA sollte der Einfluss der Guanidiniumgruppe auf die DNA-Affinität bestimmt werden. Das Dimer **7** bindet mit einer $K_a = 10^7 \text{ M}^{-1}$ um fast 2 Größenordnungen stärker als das Dimer **1**. Dieser Affinitätsanstieg lässt sich durch die zusätzlichen positiven Ladungen der Guanidiniumgruppen im Calixaren-Dimer erklären. Die Guanidiniumgruppen können besser und tiefer als die Anilingroupen in die große Furche der DNA eindringen. Durch elektrostatische Wechselwirkungen der positiven Dimerladungen mit dem negativ geladenen Phosphat-Rückgrat könnte der DNA-Calixaren-Komplex eine zusätzliche Stabilisierung erfahren. Interessanterweise besitzt Dimer **7** eine Komplexstöchiometrie (6:1), die mehr als halb so groß ist wie die des Dimers **1**.

Die Fluoreszenztitrationsen der Monomere **M1** und **M7** mit 12 BP [Fl]-DNA ergab, dass das Anilincalixaren-Monomer **M1** um eine, das Guanidinium-Monomer **M7** gleich um zwei Größenordnungen schwächer an DNA bindet, als die zugehörigen Dimere. Das Monomer **M7** weist mit einer Bindungskonstante von 10^5 M^{-1} ungefähr die gleiche Affinität zu DNA auf, wie das Dimer **1**. Der DNA-Komplex des Monomers **M1** ist mit Abstand am schwächsten ($K_a = 10^4 \text{ M}^{-1}$). Die Komplexstöchiometrien beider Monomere sind mit den erhaltenen Werten der analogen Dimere vergleichbar. Auch hier besitzt das Monomer **M7**, ähnlich wie das Dimer **7**, eine geringe Komplexstöchiometrie (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Assoziationskonstanten $K_a [\text{M}^{-1}]$, Komplexstöchiometrien, $\log K_a$ und freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpien $\Delta G [\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}]$ für die Komplexe der Dimere **1**, **7** und Monomere **M1**, **M7** mit 12 BP [Fl]-DNA.

12 BP [Fl]-DNA				
	$K_a [\text{M}^{-1}]$	Stöch.	$\log K_a$	$\Delta G [\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}]$
1	$8.0 \cdot 10^5 (\pm 23\%)$	18:1	5.9	-8.0
7	$1.3 \cdot 10^7 (\pm 19\%)$	6:1	7.1	-9.7
M1	$4.7 \cdot 10^4 (\pm 60\%)$	18:1	4.7	-6.3
M7	$7.0 \cdot 10^5 (\pm 78\%)$	8:1	5.8	-7.9

Stöchiometrie angegeben als [Rezeptor] : [DNA]

Bei der Bestimmung der K_a -Werte für die beiden Monomere wurden große Fehler (%) erhalten, da ihre Bindungskurven zu Beginn der Titration einen sigmoidalen Verlauf zeigen (Abbildung 43). Diese Sigmoidalität weist auf einen kooperativen Effekt hin. Durch Bindung bzw. Anlagerung eines Calixaren-Monomers an die DNA wird die Anlagerung eines zweiten Monomers an die DNA-Doppelhelix begünstigt.

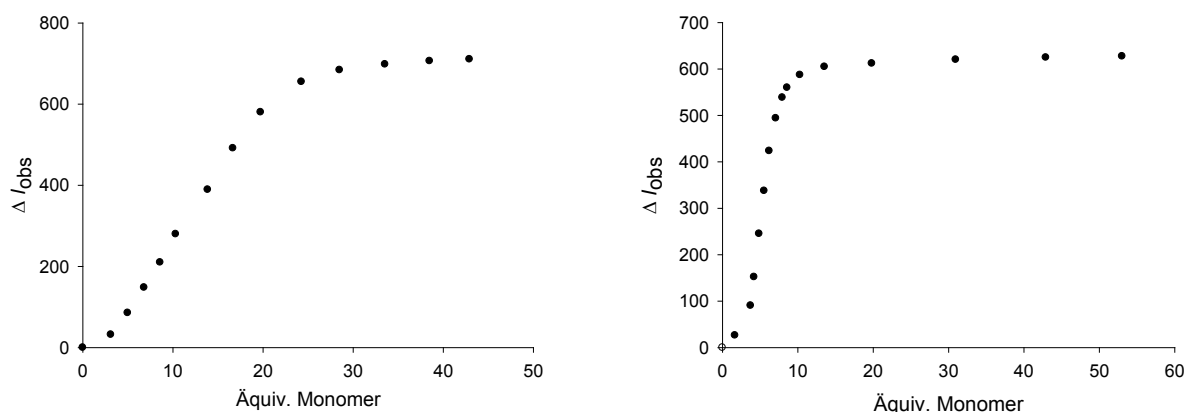


Abbildung 43: Ermittelte Bindungsisothermen der Monomere **M1** (links) und **M7** (rechts) bei der Titration gegen 12 BP [Fl]-DNA.

Bei genauer Betrachtung der Fluoreszenzspektren von den beiden Guanidiniumderivaten **7** und **M7** lässt sich ein schwacher bathochromer Effekt erkennen, der mit zunehmender Rezeptorkonzentration immer ausgeprägter erscheint (Abbildung 44). Dieser bathochrome Effekt ist sicherlich auf die Komplexbildung zurückzuführen. Scheinbar tragen die Guanidiniumgruppen dazu bei, da bei den Anilincalixarenen solche Effekte nicht beobachtet wurden.

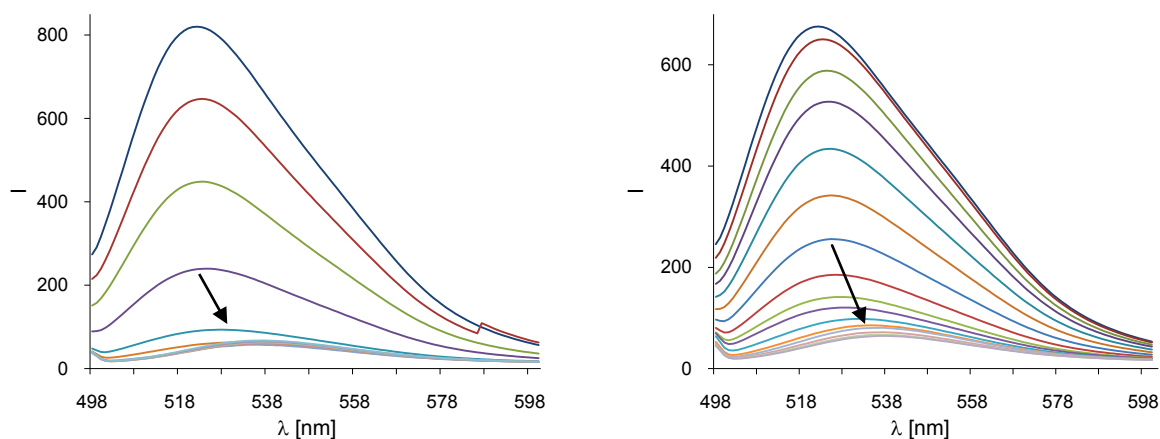


Abbildung 44: Fluoreszenzspektren des Dimers **7** (links) und Monomers **M7** (rechts) mit 12 BP [Fl]-DNA. Die Pfeile zeigen den bathochromen Effekt.

Zusätzlich zu der Fluoreszenztitration des Dimers **7** mit 12 BP [Fl]-DNA wurden die Affinitäten gegenüber 12 BP (AT) [Fl]-DNA, 12 BP (GC) [Fl]-DNA und 12 BP [6-FAM]-RNA bestimmt. Die erhaltenen Assoziationskonstanten K_a , Komplexstöchiometrien, der $\log K_a$ und die freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpie ΔG sind in den Tabellen 10 und 11 wiedergegeben und werden dort mit den Werten für das Dimer **1** verglichen.

Tabelle 10: Assoziationskonstanten $K_a [M^{-1}]$, Komplexstöchiometrien, $\log K_a$ und freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpien $\Delta G [kcal \cdot mol^{-1}]$ für die Komplexe der Dimere **1** und **7** mit 12 BP(GC) [Fl]-DNA.

12 BP (GC) [Fl]-DNA				
	$K_a [M^{-1}]$	Stöch.	$\log K_a$	$\Delta G [kcal \cdot mol^{-1}]$
1	$5.9 \cdot 10^5 (\pm 17\%)$	14:1	5.8	-7.8
7	$1.3 \cdot 10^6 (\pm 19\%)$	6:1	6.1	-8.3

Stöchiometrie angegeben als [Rezeptor] : [DNA]

Tabelle 11: Assoziationskonstanten $K_a [M^{-1}]$, Komplexstöchiometrien, $\log K_a$ und freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpien $\Delta G [kcal \cdot mol^{-1}]$ für die Komplexe der Dimere **1** und **7** mit 12 BP(AT) [Fl]-DNA und 12 BP [6-FAM]-RNA.

12 BP (AT) [Fl]-DNA					12 BP [6-FAM]-RNA			
	$K_a [M^{-1}]$	Stöch.	$\log K_a$	$\Delta G [kcal \cdot mol^{-1}]$	$K_a [M^{-1}]$	Stöch.	$\log K_a$	$\Delta G [kcal \cdot mol^{-1}]$
1	$3.6 \cdot 10^5 (\pm 20\%)$	22:1	5.6	-7.5	$9.9 \cdot 10^4 (\pm 19\%)$	17:1	5.0	-6.8
7	$2.2 \cdot 10^7 (\pm 24\%)$	9:1	7.3	-10.0	$6.9 \cdot 10^6 (\pm 12\%)$	7:1	6.8	-9.3

Stöchiometrie angegeben als [Rezeptor] : [DNA]

Alle ermittelten K_a -Werte des Dimers **7** sind größer als für das Dimer **1**, jedoch wurden die besten Affinitäten für die 12 BP [Fl]-DNA ($K_a = 1.3 \cdot 10^7 M^{-1}$) und 12 BP (AT) [Fl]-DNA ($K_a = 2.2 \cdot 10^7 M^{-1}$) erhalten. Die Bindungskonstante für die Titration von Dimer **7** mit 12 BP (GC) [Fl]-DNA ist nur um eine halbe Größenordnung höher. Für alle Titrationsen mit dem Dimer **7** wurden geringe Komplexstöchiometrien erhalten. Die zusätzlichen positiven Ladungen des Dimers **7** könnten für zusätzliche elektrostatische Wechselwirkungen mit der DNA verantwortlich sein, und so zu höheren Assoziationskonstanten führen.

3.3.1.3 Fluoreszenztitrationsen der Dimere 1 und 7 mit 12 BP [Fl]-DNA unter erhöhter Salzkonzentration

Durch eine Erhöhung der Salzkonzentration in der verwendeten Pufferlösung auf physiologische Bedingungen (150 mM) sollten unspezifische Beiträge bei der Komplexbindung unterdrückt werden. Durch Bestimmung der Assoziationskonstanten und direktem Vergleich der Titrationsergebnisse mit der „unphysiologischen“ Pufferlösung sollte geprüft werden, inwieweit unspezifische Wechselwirkungen an der Komplexbindung beteiligt sein könnten. Hierzu wurden exemplarisch die beiden Dimere **1** und **7** unter erhöhter Salzkonzentration gegen 12 BP [Fl]-DNA titriert. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Titrationen zusammengefasst.

Tabelle 12: Assoziationskonstanten K_a [M^{-1}], Komplexstöchiometrien, $\log K_a$ und freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpien ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$] für die Komplexe der Dimere **1** und **7** mit 12 BP [Fl]-DNA in unterschiedlichen Pufferlösungen.

12 BP [Fl]-DNA					
	Puffer	K_a [M^{-1}]	Stöch.	$\log K_a$	ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$]
1	1 mM Hepes*	$8.0 \cdot 10^5 (\pm 23\%)$	18:1	5.9	-8.0
1	2 mM Hepes, 150 mM NaCl*	$4.0 \cdot 10^4 (\pm 15\%)$	50:1	4.6	-6.2
7	1 mM Hepes*	$1.3 \cdot 10^7 (\pm 19\%)$	6:1	7.1	-9.7
7	2 mM Hepes, 150 mM NaCl*	$1.3 \cdot 10^5 (\pm 12\%)$	11:1	5.1	-6.9

* in Wasser/Methanol 1:1, pH 7.1; Stöchiometrie angegeben als [Rezeptor] : [DNA]

Es zeigte sich, dass die K_a -Werte beider Dimere aufgrund der erhöhten Salzkonzentration deutlich verringert wurden, bei Dimer **1** um eine Größenordnung von $10^5 M^{-1}$ auf $10^4 M^{-1}$, bei Dimer **7** gleich um zwei Größenordnungen von $10^7 M^{-1}$ auf $10^5 M^{-1}$. Trotzdem weisen die erhaltenen Bindungskonstanten immer noch auf eine starke Bindung hin. Aus diesen Werten lässt sich aber auch entnehmen, dass für die Bindung der Dimere an die DNA elektrostatische (unspezifische) Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Logischerweise sind die Effekte bei Dimer **7** größer, da es wegen seiner Guanidiniumgruppen dreimal so viele positive Ladungen wie Dimer **1** besitzt. Auch die Komplexstöchiometrien der Dimere steigen, bei Dimer **7** um das Doppelte, bei Dimer **1** drastischer um fast 2/3 des Ausgangswertes.

Die hier erfolgten Fluoreszenztitrationsen wurden ebenfalls mit den von *W. Hu* dargestellten Benzylammonium- und Benzylguanidiniumcalixarenderivaten (**A** und **B**) durchgeführt.^[151] Die Molekülstrukturen sind in Abbildung 45 dargestellt.

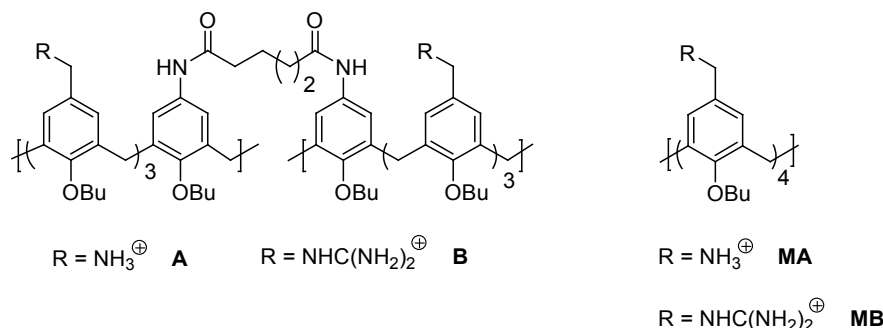


Abbildung 45: Die von *W. Hu*^[151] dargestellten Benzylammonium- und Benzylguanidiniumderivate **A**, **B**, **MA** und **MB**.

Diese Mono- und Dimere sind bei neutralem pH-Wert durchweg positiv geladen. Die Benzylammoniumgruppen verfügen über einen $\text{p}K_a$ von 10.2^[152]. Zusätzlich zeichnen sich diese Derivate durch ihre Wasserlöslichkeit aus, die Experimente konnten in wässriger, gepufferter Lösung vorgenommen werden. Zum direkten Vergleich wurden allerdings auch Experimente in Methanol/Wasser 1:1-Gemischen durchgeführt. Hier sollen kurz die von *W. Hu*^[151] für die Dimere **A** und **B**, sowie Monomere **MA** und **MB** erhaltenen Daten aus den Fluoreszenztitrationsen mit 12 BP DNA mit denen der bereits vorgestellten Calixaren-Mono- und –Dimere **1**, **7**, **M1** und **M7** verglichen werden. Dazu sind ausgewählte Ergebnisse von *W. Hu* in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Die von *W. Hu* bestimmten Assoziationskonstanten K_a und Komplexstöchiometrien für die Calixarenderivate **A**, **B**, **MA** und **MB** mit 12 BP [FI]-DNA.^[151]

12 BP [FI]-DNA			
	Puffer	K_a [M^{-1}]	Stöch.
A	2 mM Hepes, 150 mM NaCl, MeOH/H ₂ O 1:1 pH 7.1	$4 \cdot 10^7$	9:1
B	2 mM Hepes, 150 mM NaCl, MeOH/H ₂ O 1:1 pH 7.1	$9 \cdot 10^6$	11:1
A	2 mM Hepes, 150 mM NaCl, H ₂ O pH 7.1	$6 \cdot 10^6$	10:1
B	2 mM Hepes, 150 mM NaCl, H ₂ O pH 7.1	$9 \cdot 10^5$	23:1
MA	25 mM Hepes, 150 mM NaCl, H ₂ O pH 7.1	$1 \cdot 10^6$	18:1
MB	25 mM Hepes, 150 mM NaCl, H ₂ O pH 7.1	$4 \cdot 10^5$	14:1

Die erhaltenen Assoziationskonstanten in der Pufferlösung mit 50% Methanol lassen sich direkt mit denen der Dimere **1** und **7** vergleichen. Während die K_a für das Dimer **A** um drei Größenordnungen höher ist als für **1**, ist die K_a für das Dimer **B** um fast zwei Größenordnungen höher als für **7**. Eine mögliche Erklärung für die hohe Bindungskonstante für **A** sind die permanent positiv geladenen Ammoniumgruppen am oberen Rand, die zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat der DNA zur Stabilisierung des Komplexes eingehen können. Darüberhinaus ragen die Ammonium- bzw. Guanidiniumgruppen der Dimere **A** und **B** weiter heraus, als bei den Dimeren **1** und **7**, was zu einer besseren Erreichbarkeit der Basen in der Furche führen könnte. In wässriger, gepufferter Lösung sind die Assoziationskonstanten von beiden Dimeren **A** und **B** um jeweils eine Größenordnung kleiner. Insgesamt besitzen die Dimere **A** und **B** eine ähnliche Komplexstöchiometrie, wie der für das Dimer **7** ermittelte Wert. Nur in Wasser ist die Stöchiometrie des Benzylguanidinium-calixaren-Dimers **B** doppelt so groß wie in dem Methanol/Wasser-Gemisch. Die Monomere **MA** und **MB**, deren Fluoreszenztitrationen in der 50%igen methanolischen Pufferlösung nicht ausgewertet werden konnten, zeigten in wässriger Lösung sehr hohe Werte für die Assoziationskonstanten, die mit den erhaltenen Werten für die Dimere vergleichbar sind.

Festgehalten werden kann, dass die Dimere **A** und **B** eine größere Affinität für DNA zeigen, als die Dimere **1** und **7**. Dies kann darin begründet liegen, dass **A** und **B** bei neutralem pH vollständig protoniert vorliegen und so mehrere starke, elektrostatische Wechselwirkungen zur DNA ausbilden können. Außerdem ragen die Ammonium- und Guanidiniumfunktionen der Dimere **A** und **B** weiter aus dem Kelch heraus und können durch diese erhöhte Flexibilität besser die DNA-Basen auf dem Grund der Furche erreichen.

3.3.1.4 Fluoreszenztitrationen der Mono- und Dimere 1, 7, M1 und M7 mit 20 BP Polynucleotiden

Um den Bindungsmodus weiter aufzuklären, sollten nun die 20 BP langen Polynucleotide 20 BP (AT) [Fl]-DNA, 20 BP (GC) [Fl]-DNA und 20 BP [6-FAM]-RNA mit den Mono- und Dimeren untersucht werden. Viele kleine-Furche-Binder lagern sich bevorzugt in AT-reichen

DNA-Sequenzen ein, da in GC-reichen Abschnitten das Vorhandensein der exocyclischen Aminogruppe des Guanins eine Bindung stört.^[9, 153] Bei vergleichbar guter Bindung von GC- und AT-DNA kann eine Bindung in der kleinen Furche weiter ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Titrationsen sind in den beiden folgenden Tabellen zusammengefasst.

Tabelle 14: Assoziationskonstanten K_a [M^{-1}], Komplexstöchiometrien, $\log K_a$ und freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpien ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$] für die Komplexe der Mono- und Dimere **1**, **7**, **M1** und **M7** mit 20 BP (GC) [FI]-DNA.

20 BP (GC) [FI]-DNA				
	K_a [M^{-1}]	Stöch.	$\log K_a$	ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$]
1	$3.1 \cdot 10^5$ (20%)	19:1	5.5	-7.5
7	$7.0 \cdot 10^6$ (58%)	12:1	6.8	-9.3
M1	$2.4 \cdot 10^6$ (22%)	32:1	6.4	-8.6
M7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Stöchiometrie angegeben als [Rezeptor] : [DNA]; n.d. = nicht detektierbar

Tabelle 15: Assoziationskonstanten K_a [M^{-1}], Komplexstöchiometrien, $\log K_a$ und freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpien ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$] für die Komplexe der Mono- und Dimere **1**, **7**, **M1** und **M7** mit 20 BP (AT) [FI]-DNA und 20 BP [6-FAM]-RNA.

20 BP (AT) [FI]-DNA					20 BP [6-FAM]-RNA			
	K_a [M^{-1}]	Stöch.	$\log K_a$	ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$]	K_a [M^{-1}]	Stöch.	$\log K_a$	ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$]
1	$1.2 \cdot 10^6$ (28%)	18:1	6.1	-8.3	$5.4 \cdot 10^5$ (24%)	16:1	5.7	-7.8
7	$2.6 \cdot 10^6$ (19%)	11:1	6.4	-8.7	$1.9 \cdot 10^6$ (23%)	11:1	6.3	-8.5
M1	$5.7 \cdot 10^5$ (25%)	30:1	5.8	-7.8	$1.3 \cdot 10^6$ (25%)	30:1	6.1	-8.3
M7	$7.8 \cdot 10^5$ (37%)	16:1	5.9	-8.0	$2.0 \cdot 10^6$ (26%)	11:1	6.3	-8.5

Stöchiometrie angegeben als [Rezeptor] : [DNA]

Die Ergebnisse zeigen, dass für das Dimer **7** bessere bzw. ähnliche K_a -Werte für GC-DNA gegenüber AT-DNA und RNA erhalten wurden. Im Gegensatz dazu bindet das Dimer **1** AT-DNA etwas besser als GC-DNA und RNA.

Diese Ergebnisse liefern einen weiteren Hinweis darauf, dass die Calixaren-Dimere mit hoher Wahrscheinlichkeit in der großen Furche von DNA bindet, da die Werte für die Assoziationskonstanten mit der GC-DNA sonst deutlich kleiner, als gefunden, sein müssten.

Mit RNA, welche eine sehr tiefe und schmale große Furche und eine breite, flache kleine Furche besitzt, findet ebenfalls eine starke Bindung statt. Hier müsste eine Bindung in der großen Furche allerdings mit einer Aufweitung der Furche einhergehen, was durchaus denkbar wäre. Trotzdem ist zu dem derzeitigen Wissensstand der Forschung eine Einlagerung der Dimere in die kleine Furche der RNA nicht auszuschließen.

Erstaunlicherweise liegen die Werte für die Affinitätskonstanten der beiden Monomere **M1** und **M7** mit den 20 BP DNA-Strängen in der gleichen Größenordnung wie die der Dimere. Der K_a -Wert für die GC-DNA ist für **M1** sogar um eine Größenordnung besser als für das Dimer **1**. Im direkten Vergleich der AT-DNA zur RNA sind die Affinitätskonstanten beider Monomere jeweils für die RNA um eine Größenordnung stärker. Vielleicht können sich die Monomere besser in die große Furche der RNA einlagern, als die Dimere, oder aber sie muss nicht so stark aufgeweitet werden.

3.3.2 Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay

3.3.2.1 Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay der Dimere 1-6

Für den Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay, dem Standardtest zur Feststellung einer effizienten DNA-Bindung, wurde die 12 BP DNA, die auch schon für die Fluoreszenztitrationen verwendet wurde, sowie eine 20 BP DNA (siehe Kapitel 3.1.2, Tabelle 4) eingesetzt. Als Puffer wurde für die Verdrängungsexperimente, wenn nicht anders vermerkt, 1 mM Hepes in Methanol/Wasser 1:1 mit 9.4 mM NaCl (pH = 7.1) verwendet.

In Abbildung 46 ist die lineare Auftragung der relativen Fluoreszenzintensität I_{rel} als Funktion der Dimer-Äquivalente eines Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assays (Dimer 6 mit 12 BP DNA) dargestellt. 100% I_{rel} entsprechen dabei der Fluoreszenzintensität, wenn 100% des Ethidiumbromids in den DNA-Doppelstrang interkaliert sind, wie es am Anfang des Verdrängungs-Assays der Fall ist. Der Nullwert entspricht der Fluoreszenzintensität von frei in der Lösung vorliegendem Ethidiumbromid. Der aus der Geradengleichung zugängliche C_{50} -Wert (Einsetzen von $y = 50$), lässt sich zur Berechnung der CE-Werte einsetzen. So kann eine Auftragung der relativen Fluoreszenzintensität I_{rel} als Funktion des Ladungsüberschusses (CE) erhalten werden.

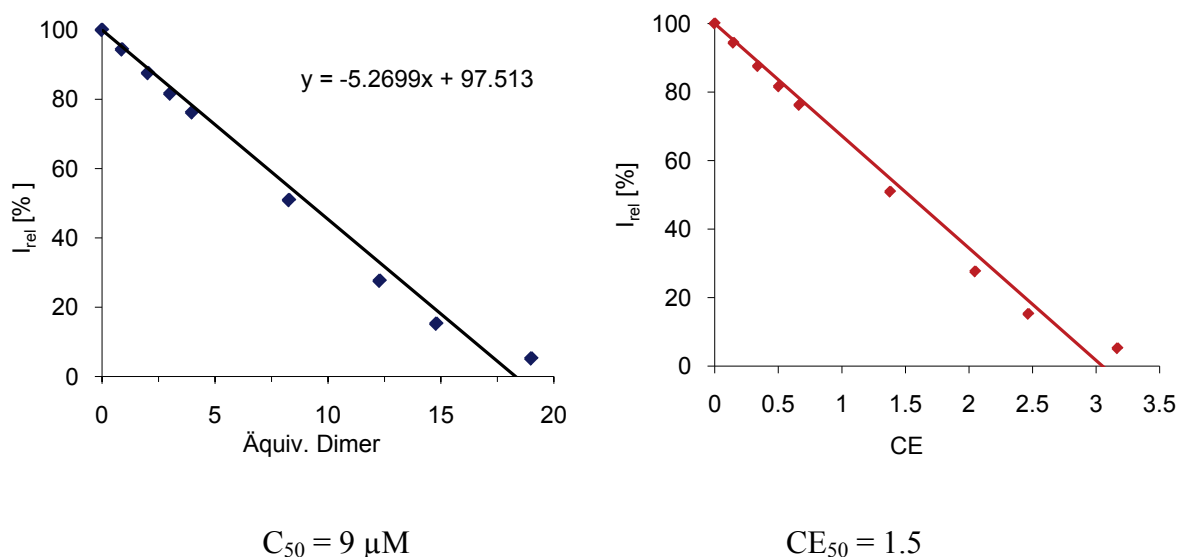


Abbildung 46: Auswertung des Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assays von Dimer 6 mit 12 BP DNA. Links: Auftragung der relativen Fluoreszenzintensität I_{rel} in % als Funktion der Äquivalente an Dimer mit zugehöriger Geradengleichung zur Bestimmung des C_{50} -Wertes. Rechts: Auftragung von I_{rel} als Funktion des CE.

In Abbildung 47 sind die Kurven des Ethidiumbromid-Assays mit graphischer Ermittlung der CE_{50} -Werte für die Dimere **1** und **6** mit 12 BP DNA gezeigt. Dabei korreliert die Steilheit der Kurve mit der DNA-Affinität.

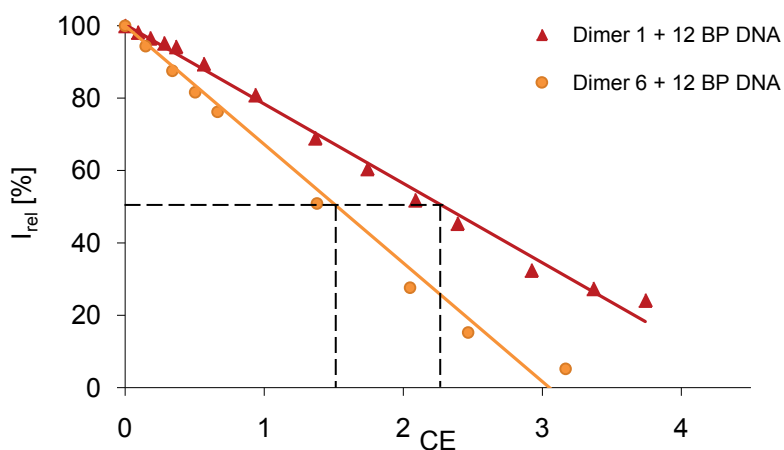


Abbildung 47: Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay der Dimere **1** und **6** mit 12 BP DNA. Die gestrichelte Linie zeigt die CE_{50} -Werte auf der x-Achse an.

Die Auftragung gegen den CE erlaubt einen direkten Vergleich der Dimeraffinität. Die unterschiedliche Ladung ist in diesen Graphen schon berücksichtigt, so dass durch die Steilheit der Steigung die jeweilige Affinität direkt abgelesen werden kann. Abbildung 48 zeigt die graphische Auftragung der Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assays für die Dimere **1-6** mit 12 BP DNA und 20 BP DNA und Tabelle 16 die zugehörigen C_{50} - und CE_{50} -Werte.

Tabelle 16: C_{50} - und CE_{50} -Werte der Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assays der Dimere **1-6** mit 12 BP und 20 BP DNA.

Rezeptor	Ladung	12 BP DNA		20 BP DNA	
		C_{50} [μ M]	CE_{50}	C_{50} [μ M]	CE_{50}
1	+2	28	2.3	28	1.4
2	+2	36	3.0	32	1.6
3	+2	24	2.0	23	1.2
4	+2	36	3.0	26	1.3
5	+4	12	2.0	18	1.8
6	+4	9	1.5	12	1.2

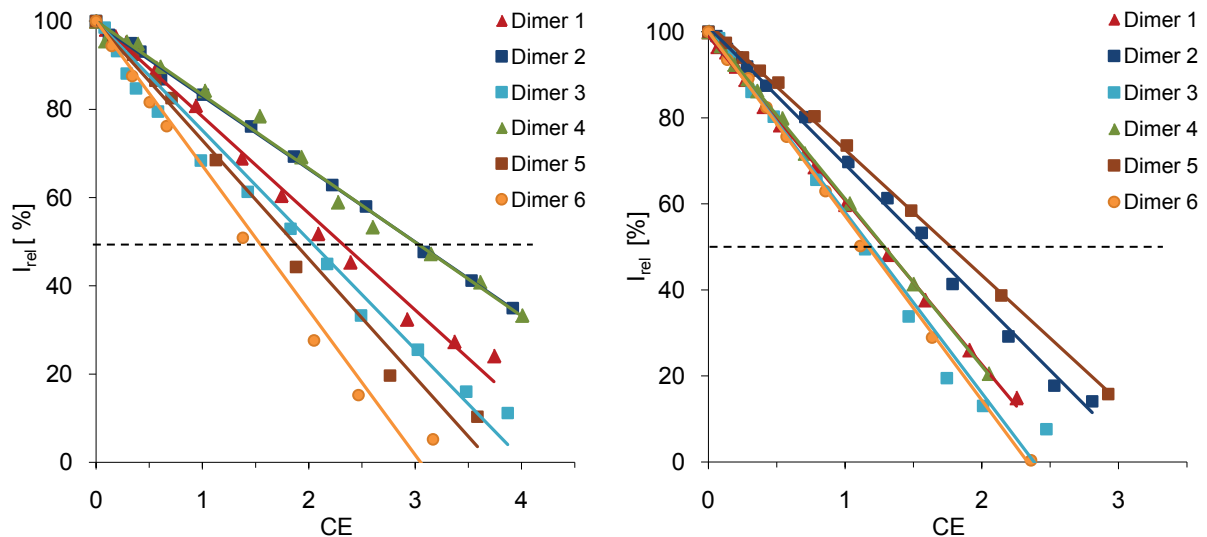


Abbildung 48: Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay der Dimere 1-6 mit 12 BP DNA (links) und 20 BP DNA (rechts).

Die in Kapitel 3.3.1. ermittelten hohen Bindungskonstanten werden durch die Ergebnisse der Ethidiumbromid-Verdrängungs-Experimente bestätigt. Ähnlich wie das Dimer 1 vermögen alle Dimere 2-6 das in die Basenpaare der DNA interkalierte Ethidiumbromid komplett zu verdrängen. Dabei wurden für das Ladungsüberschussverhältnis bei 50 % Ethidiumbromid-Verdrängung (CE_{50}) sehr niedrige Werte erhalten, besonders für das Dimer 6 ($CE_{50} = 1.5$ und 1.2). Verglichen mit dem stark an das Phosphatrückgrat der DNA bindenden Polyamin Spermin, gehören diese ermittelten Werte zu den niedrigsten für DNA-bindende Moleküle überhaupt. Die erhaltenen CE_{50} -Werte waren für die Verdrängung des Farbstoffes aus der 20 BP DNA für alle untersuchten Dimere niedriger, als für die 12 BP DNA. Selbst bei Erhöhung der Salzkonzentration von 9 mM auf physiologische Konzentrationen (150 mM NaCl), konnte exemplarisch für das Dimer 1 ($C_{50} = 65 \mu\text{M}$, $CE_{50} = 3.3$, für 20 BP DNA) ein CE_{50} -Wert erhalten werden, der um das 300-fache niedriger ist als für Spermin (siehe Abbildung 49). Diese Ergebnisse unterstreichen noch einmal die Bedeutung der hydrophoben Kräfte für diesen Bindungsprozess und schließen eine signifikante DNA-Rückgrat-Erkennung durch elektrostatische Wechselwirkungen als Hauptbindungsmodus aus.^[154]

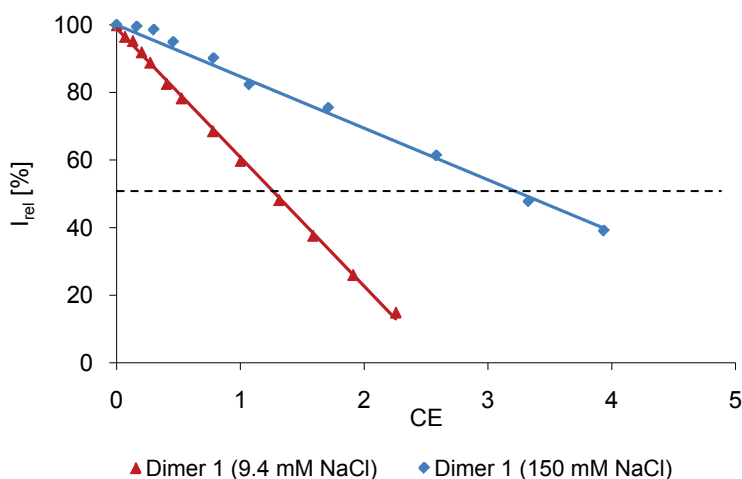


Abbildung 49: Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay mit **1** und 20 BP DNA mit 9.4 mM und 150 mM NaCl.

Die Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assays mit dem Guanidinium-Dimer **7** und den Monomeren **M1** und **M7** wurden analog der oben beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wurden die erhaltenen Ergebnisse dieser Substanzen stets mit dem Dimer **1** verglichen. In Abbildung 50 ist die Ethidiumbromid-Verdrängung graphisch dargestellt und Tabelle 17 liefert die dazu gehörigen C_{50} - und CE_{50} -Werte.

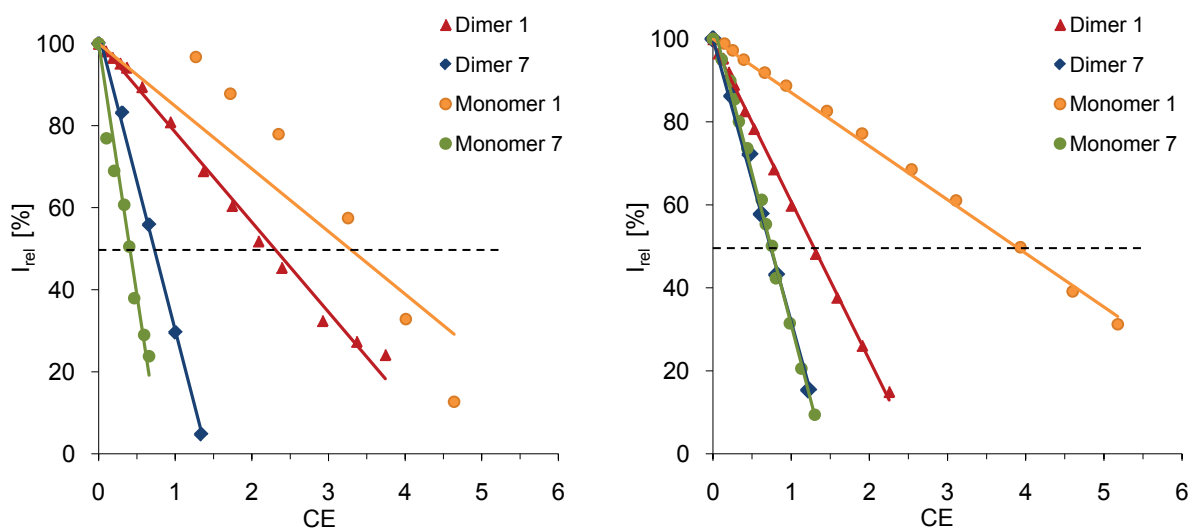


Abbildung 50: Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay der Dimere **1** und **7**, sowie der Monomere **M1** und **M7** mit 12 BP DNA (links) und 20 BP DNA (rechts).

Trotz seiner höheren positiven Ladung (+6 statt +2) zeigt das Dimer **7** mit 0.7 und 0.8 sehr niedrige CE_{50} -Werte für 12 BP DNA und 20 BP DNA. Diese Werte resultieren aus den bisher niedrigsten für die Dimere ermittelten C_{50} -Werten (3.2 μ M und 4.9 μ M). Nur das Guanidinium-Monomer **M7** weist einen kleineren Wert für die C_{50} - und CE_{50} -Werte auf. Das Anilin-Monomer **M1** verdrängt Ethidiumbromid aus beiden DNA-Doppelsträngen am schlechtesten. Auch streuen hier die erhaltenen Werte am meisten. Dass der Verlauf anfangs nicht linear ist, weist erneut auf einen kooperativen Prozess hin.

Tabelle 17: C_{50} - und CE_{50} -Werte der Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assays der Dimere **1** und **7**, sowie Monomere **M1** und **M7** mit 12 BP DNA und 20 BP DNA.

Rezeptor	Ladung	12 BP DNA		20 BP DNA	
		C_{50} [μ M]	CE_{50}	C_{50} [μ M]	CE_{50}
1	+2	28	2.3	25	1.2
7	+6	3.2	0.8	4.9	0.7
M1	+2	40	3.3	77	3.9
M7	+4	2.4	0.4	7.5	0.8

Festzustellen ist, dass die Anzahl der gegenteiligen Ladungen des Rezeptormoleküls mit der DNA-Affinität korreliert. Das Guanidinium-Dimer **7**, sowie das dazugehörige Monomer **M7** können Ethidiumbromid am wirkungsvollsten verdrängen. Ihre niedrigen C_{50} -Werte werden dabei allerdings auch von extrem niedrigen CE_{50} -Werten begleitet. Dieser Befund schließt einen Bindungsmodus, der hauptsächlich aus unspezifischen Anteilen besteht, aus. Vielmehr scheint auch hier das Dimer **7** in die große Furche der DNA eingelagert zu werden.

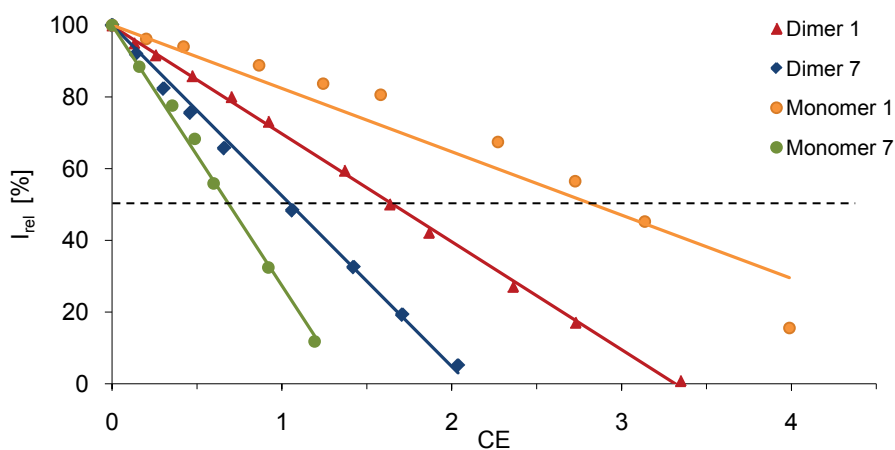
Interessanterweise sind die C_{50} - und CE_{50} -Werte für die Dimere **A** und **B** für 12 BP DNA viel höher als die der Dimere **1** und **7**. Für die Messungen mit der 20 BP DNA wurden von *W. Hu*^[151] jedoch Werte ermittelt, die denen der Dimere **1** und **7** ähnlich sind. Dabei zeigt das Dimer **7** jeweils die höchsten CE_{50} -Werte. Die Werte für die Monomere **A** und **B** sind für die 12 BP DNA höher als die der korrespondierenden Dimere und gleich für die 20 BP DNA.

Tabelle 18: Die von W. Hu ermittelten C_{50} - und CE_{50} -Werte für die Benzylammonium- und Benzylguanidiniumderivate.^[151]

Rezeptor	Ladung	12 BP DNA		20 BP DNA	
		C_{50} [μ M]	CE_{50}	C_{50} [μ M]	CE_{50}
A	+6	33	8.2	7	1.1
B	+6	28	7.1	9	1.3
MA	+4	13	2.1	13	1.3
MB	+4	20	3.3	12	1.2

3.3.3 DAPI-Verdrängungs-Assay

Durch die Untersuchung der Verdrängungseigenschaften der Dimere **1** und **7**, sowie der entsprechenden Monomere **M1** und **M7** von DAPI, welches sich in AT-reichen Sequenzen in die kleine Furche der DNA einlagert,^[126] sollte der postulierte Bindungsmodus bekräftigt werden. Analog dem Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay wurde auch hier die relative Fluoreszenzintensität I_{rel} gegen den CE aufgetragen. Abbildung 51 zeigt die graphische Auftragung des Assays und in Tabelle 19 sind die erhaltenen C_{50} - und CE_{50} -Werte für die DNA-Binder aufgeführt.

**Abbildung 51:** DAPI-Verdrängungs-Assay der Dimere **1** und **7**, sowie der Monomere **M1** und **M7** mit 20 BP (AT) DNA.

Wie beim Ethidiumbromid-Assay konnte auch der Farbstoff DAPI durch Zugabe der Testsubstanzen nahezu vollständig aus der kleinen Furche verdrängt werden. Die hier erhaltenen Werte sind mit den entsprechenden Werten aus dem Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay vergleichbar. Dabei wurden die niedrigsten C_{50} - und CE_{50} -Werte ebenfalls für die beiden Guanidiniumcalixarene Dimer **7** und Monomer **M7** erhalten. Das Monomer **M1** besitzt auch hier die mit Abstand höchsten Werte.

Tabelle 19: C_{50} - und CE_{50} -Werte des DAPI-Verdrängungs-Assays der Dimere **1** und **7**, sowie Monomere **M1** und **M7** mit 20 BP (AT) DNA.

	Dimer 1	Dimer 7	Mono M1	Mono M7
Ladung	+2	+6	+2	+4
C_{50} [μ M]	33	7	63	7
CE_{50}	1.7	1.1	3.2	0.7

Mit den erhaltenen Ergebnissen wurde gezeigt, dass die Rezeptoren durch ihre Bindung mit der DNA den kleine-Furche-Binder DAPI effizient verdrängen können. Diese Verdrängung steht allerdings nicht zwingend im Zusammenhang mit einer Bindung des Rezeptors in der kleinen Furche, denn der Farbstoff könnte auch durch eine Anlagerung der Dimere in der großen Furche der DNA freigesetzt werden.^[126] Mit Bestimmtheit lässt sich aus diesen Ergebnissen aber eine Bindung in der Furche ableiten. Auch hier müssten für eine unspezifische Bindung der Rezeptoren an das DNA-Rückgrat viel höhere CE_{50} -Werte erhalten werden. Vielmehr scheint es so zu sein, dass neben der Basenerkennung in der großen Furche zusätzlich Kontakte zum Phosphatrückgrat ausgebildet werden können.

3.3.4 UV-Vis-Schmelzkurven

Eine Methode zur Untersuchung der Stabilität von DNA-Komplexen ist das Studium der thermischen DNA-Denaturierung mittels UV-Vis-Spektroskopie. Dazu wurden UV-Vis-Schmelzkurven von Doppelstrang-DNA vor und nach Zugabe des jeweiligen Rezeptors, bei einer Wellenlänge von 260 nm, gemessen. Für die Messungen wurden 12 BP DNA- und 20 BP DNA-Doppelstränge, die auch schon für den Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay und die Fluoreszenztitrationsen eingesetzt wurden, verwendet (siehe Kapitel 3.1.3, Tabelle 6). Für die thermischen Denaturierungsstudien wurden 2 μM DNA-Lösungen und 60 μM (30 eq.) Calixarenlösungen verwendet. Alle mit 12 BP DNA durchgeführten Messungen wurden in 1 mM Hepes-Puffer mit 50% Methanol (pH = 7.1) durchgeführt, die Messungen mit den 20 BP DNA-Doppelhelices in 2 mM Hepes-Pufferlösung mit 50% Methanol und 9.4 mM NaCl-Gehalt (pH = 7.1).

In Abbildung 52 ist exemplarisch die bei 260 nm aufgenommene Schmelzkurve der 12 BP DNA mit sigmoidalem Verlauf dargestellt. Durch Bildung der ersten Ableitung durch das Programm *OriginPro 7.5*^[155] konnte eine Schmelztemperatur von $T_m^\circ = 34^\circ\text{C}$ ermittelt werden.

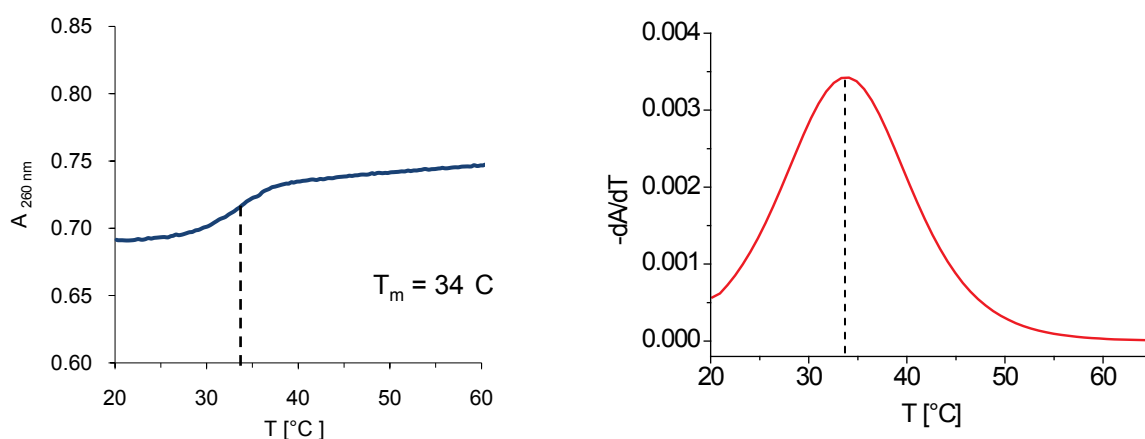


Abbildung 52: Schmelzkurve von 12 BP DNA (links); der Wendepunkt der Kurve entspricht der Schmelztemperatur T_m° und wird über die erste Ableitung (rechts) berechnet.

Bei Bindung eines Liganden an den DNA-Doppelstrang findet für Interkalatoren und Furchebinder eine Stabilisierung der DNA in diesem Komplex statt. Die Schmelzkurve wird nach rechts, hin zu größeren Schmelzpunkten, verschoben.^[156]

Die UV-Schmelzkurven von Doppelstrang-DNA in Gegenwart der Calixaren-Dimere **1-6** zeigen drastische Unterschiede im Gegensatz zur reinen DNA-Schmelzkurve. Die Kurven zeigen einen inversen Verlauf mit einer stark erhöhten Absorptionsintensität zu Anfang der Messung. Die Dimere alleine zeigen unter gleichen Bedingungen einen nahezu horizontalen Linienvverlauf.

In Abbildung 53 ist die UV-Vis-Schmelzkurve der 12 BP DNA mit und ohne Dimer **6** gezeigt. Wie zu erwarten, konnte die Schmelztemperatur der DNA durch das Dimer **6** stabilisiert werden ($T_m = 53^\circ\text{C}$).

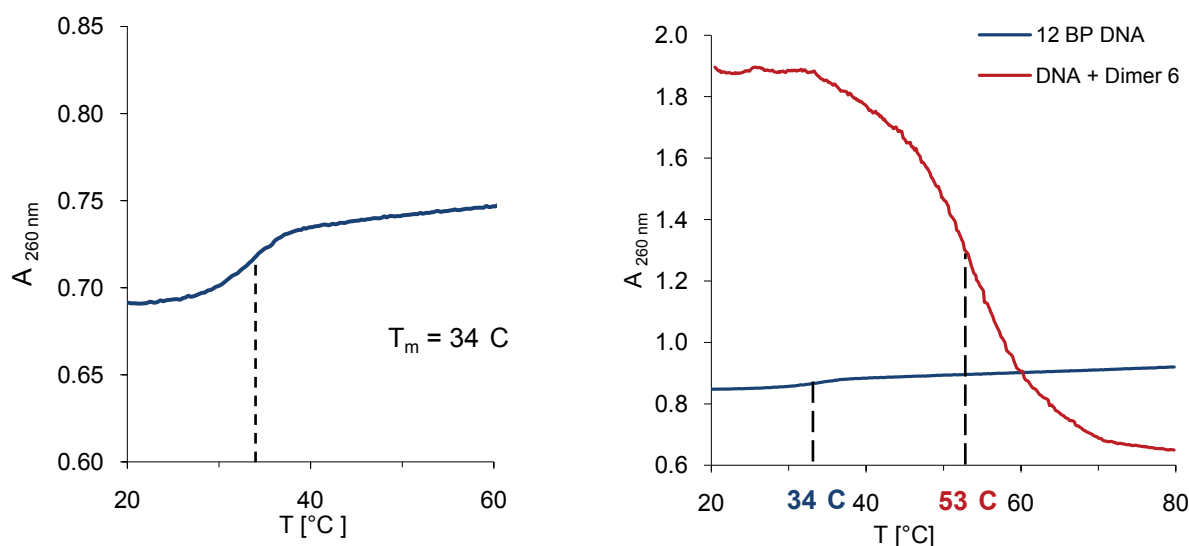


Abbildung 53: Links: UV-Vis-Schmelzkurve der 12 BP DNA. Rechts: UV-Vis-Schmelzkurven der 12 BP DNA mit (rot) und ohne (blau) Dimer **6**. Der Wendepunkt entspricht dem Schmelzpunkt T_m .

Die UV-Absorption ist zu Beginn der Messung drastisch zu höheren Werten für die Komplexe mit Doppelstrang-DNA verschoben. Diese erhöhte Absorptionsintensität ist durch die π - π^* -Übergänge der aromatischen Areneinheiten der Calixarene zu erklären. Während des Denaturierungsprozesses wird die Anfangsabsorption nicht erhöht, sondern erniedrigt; es liegt ein viel kleinerer Extinktionskoeffizient für die DNA-Einzelstränge vor. Diese ungewöhnlichen UV-Vis-Absorptionen der DNA-Komplexe durch die Dimere und die

begleitenden vergrößerten Schmelzkurven können eigentlich nur durch starke nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen diesen Liganden und den DNA-Chromophoren, den Basenpaaren, erklärt werden.

Die für die DNA-Komplexe mit den Dimeren **1-6** erhaltenen Schmelzkurven und ihre dazugehörigen Schmelztemperaturen sind in Abbildung 54 und Tabelle 20 dargestellt.

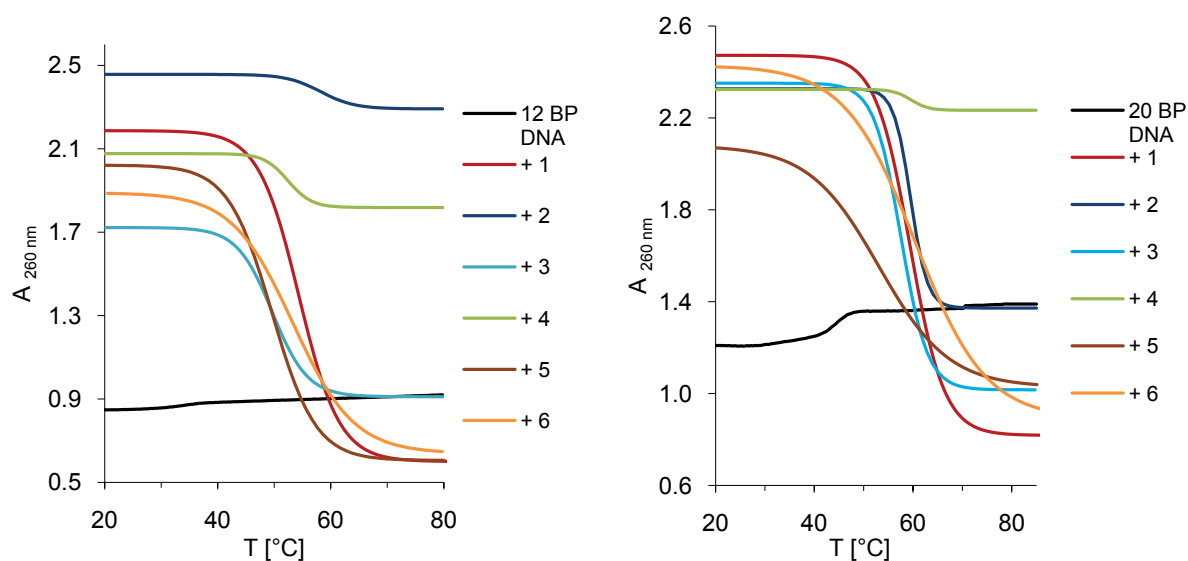


Abbildung 54: UV-Vis-Schmelzkurven der Dimere **1-6** mit 12 BP DNA (links) und 20 BP DNA (rechts).

Tabelle 20: Die durch UV-Vis-spektroskopische Denaturierungsstudien erhaltenen T_m und ΔT_m -Werte für die Dimere **1-6** mit 12 und 20 BP DNA.

Rezeptor	12 BP DNA*		20 BP DNA [#]	
	T_m [$^{\circ}\text{C}$]	ΔT_m [$^{\circ}\text{C}$]	T_m [$^{\circ}\text{C}$]	ΔT_m [$^{\circ}\text{C}$]
1	54	20	59	16
2	58	24	59	16
3	50	16	58	15
4	52	18	60	17
5	50	16	53	10
6	53	19	60	17

*mit T_m (12 BP DNA) = 34°C ; [#]mit T_m (20 BP DNA) = 43°C

Alle Calixaren-Dimere vermögen Doppelstrang-DNA signifikant zu stabilisieren (für 12 BP DNA: $T_m = 52-58^\circ\text{C}$, $\Delta T_m = 16-24^\circ\text{C}$). Durch eine mögliche Einlagerung von aggregierten Calixarenen in die große Furche der DNA könnten die ausgefransten Enden des kurzen DNA-Doppelstrangs zusammengehalten werden, was die hohe Komplexstabilität erklären würde. Während die UV-Absorptionsschmelzkurve am Ende der Messung für die Dimere **1**, **3**, **5** und **6** unter der Intensität der 12 BP-DNA-Einzelstränge liegt, ist sie für die Dimere **2** und **4** noch immer drastisch erhöht. Mit der 20 BP DNA wurde dieses Verhalten nur noch für das Dimer **4** beobachtet.

Die Untersuchung der thermischen Denaturierung der DNA-Doppelstränge mit dem Guanidinium-Dimer **7** und den Monomeren **M1** und **M7** zeigte ein sehr unterschiedliches Verhalten (Abbildung 55, Tabelle 21). Während das Guanidinium-Monomer **M7** die 12 BP DNA effektiv zu stabilisieren vermag ($\Delta T_m = 17^\circ\text{C}$), ist der gemessene Wert für die 20 BP DNA halb so groß. Das Monomer **M1** zeigt nur eine schwache Stabilisierung von $\Delta T_m = 8^\circ\text{C}$ für 12 BP DNA. 20 BP DNA konnte dagegen durch das Monomer **M1** nicht stabilisiert werden ($\Delta T_m = -1^\circ\text{C}$).

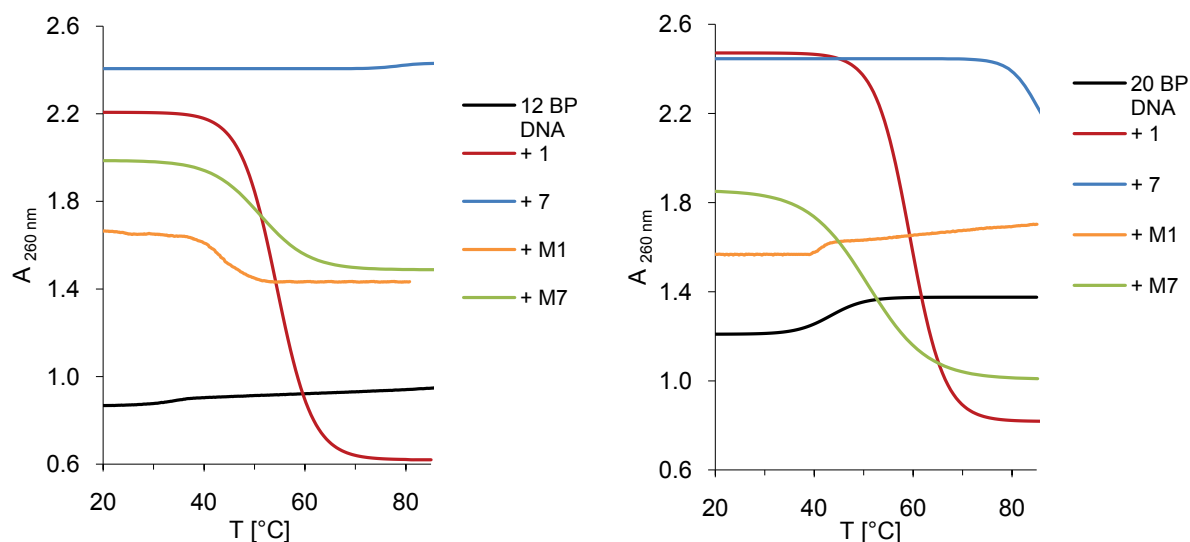


Abbildung 55: UV-Vis-Schmelzkurven der Dimere **1**, **7** und Monomere **M1**, **M7** mit 12 BP DNA (links) und 20 BP DNA (rechts).

Das Guanidiniumdimer **7** zeigt dagegen von allen bisher untersuchten Derivaten die stärkste Stabilisierung beider DNA-Stränge ($\Delta T_m > 40^\circ\text{C}$). Dabei werden für die beiden DNA-Stränge Unterschiede im Kurvenverlauf beobachtet. Im Komplex von **7** mit der 12 BP DNA wird die

Absorptionsintensität durch den Schmelzvorgang erhöht, es findet also ein üblicher Schmelzprozess statt, während sie für den 20 BP DNA-Komplex mit **7**, wie für alle anderen Dimere auch, erniedrigt wird. In Abbildung 56 ist noch einmal das unterschiedliche Schmelzverhalten des Dimers **7** im 12 BP- und 20 BP-DNA-Komplex gezeigt.

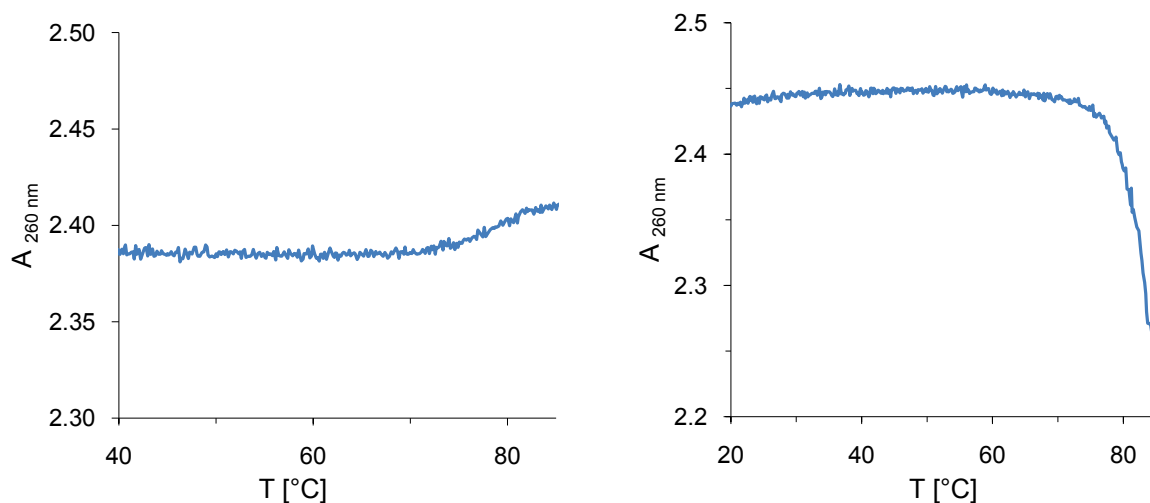


Abbildung 56: UV-Vis-Schmelzkurven von Dimer **7** mit 12 BP DNA (links) und 20 BP DNA (rechts).

Hier ist klar erkennbar, dass die Schmelzkurve von Dimer **7** mit 20 BP DNA noch nicht das Plateau bei niedrigster Absorption erreicht hat. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur würde die Absorption wahrscheinlich noch weiter fallen. Die UV-Messungen konnten allerdings aufgrund des verwendeten Puffers (50% Methanol) nicht bei Temperaturen über 85 °C durchgeführt werden.

In Tabelle 21 sind die erhaltenen Schmelzpunkte für die Guanidiniumderivate **7** und **M7** und das Anilinmonomer **M1** im Vergleich mit Dimer **1** dargestellt.

Tabelle 21: Die durch UV-Vis-spektroskopische Denaturierungsstudien erhaltenen T_m und ΔT_m -Werte für **1**, **7**, **M1** und **M7** mit 12 und 20 BP DNA.

Rezeptor	12 BP DNA*		20 BP DNA [#]	
	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
1	54	20	59	16
7	79	45	> 85	> 42
M1	42	8	42	-1
M7	51	17	51	8

*mit T_m (12 BP DNA) = 34 °C; [#]mit T_m (20 BP DNA) = 43 °C

Für die Benzylammonium- und Benzylguanidiniumderivate von *W. Hu*^[151] wurden ebenfalls Stabilisierungen der DNA-Doppelstränge erhalten (Tabelle 22). Auch für diese Systeme zeigten sich geringe ΔT_m -Werte für die Monomere mit 20 BP DNA. Auffällig ist, dass die beiden Monomere **MA** und **MB** den jeweiligen DNA-Doppelstrang gleich stark stabilisieren. Die Stabilität scheint nicht von der Struktur der beiden Monomere abzuhängen, sie muss vielmehr mit der Ladung verknüpft sein. Im Gegensatz dazu wurde die DNA von **M7** immer stärker stabilisiert als von **M1**.

Die erhaltenen ΔT_m -Werte für die Dimere **A** und **1** sind vergleichbar, **7** besitzt allerdings Werte, die mehr als doppelt so hoch sind, wie für **B**. Auch hier unterscheiden sich **A** und **B** nicht sehr voneinander, die Schmelzpunkte von **B** sind nur geringfügig höher als für **A**.

Tabelle 22: Die von *W. Hu* ermittelten T_m - und ΔT_m -Werte für die Benzylammonium- und Benzylguanidiniumderivate.^[151]

Rezeptor	12 BP DNA*		20 BP DNA [#]	
	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
A	42	13	47	16
B	50	21	51	20
MA	39	10	35	4
MB	39	10	35	4

*mit T_m (12 BP DNA) = 34°C; [#]mit T_m (20 BP DNA) = 43°C

Um weitere Hinweise auf das Stabilisierungsverhalten der Calixarene zu erhalten, wurden die Dimere **1** und **7**, sowie die Monomere **M1** und **M7** mit 20 BP (AT) DNA, 20 BP (GC) DNA, sowie 20 BP RNA getestet. Diese Doppelhelices wurden auch schon in fluoreszenzmarkierter Form für die Titrationsen verwendet (siehe Kapitel 3.3.1.4).

Bei Betrachtung der UV-Vis-Schmelzkurven werden wieder größtenteils inverse Verläufe beobachtet, außer für **M7** mit 20 BP (GC) DNA und **M1** mit 20 BP RNA. Während die Schmelzkurven der Komplexe mit Dimer **1** nicht mehr so stark abfallen, besonders mit der 20 BP (GC) DNA, zeigt das Dimer **7** diesmal inverse Kurven für alle drei Doppelstränge. Die ΔT_m -Werte sind für die Komplexe mit Dimer **7** jedoch viel niedriger, als für die gemischten 12 und 20 BP-Doppelstränge, besonders für die RNA mit einem ΔT_m = 6°C. Dimer **1** dagegen vermag alle drei Doppelstränge durchweg am besten zu stabilisieren mit ähnlichen ΔT_m -

Werten. Insgesamt zeigt **M1** wieder sehr schwache Stabilisierungen, außer für die RNA. Diese kann durch die beiden Anilinderivate viel besser stabilisiert werden, als durch die Guanidiniumderivate. Das Monomer **M7** zeigt für die RNA den schwächsten ΔT_m -Wert.

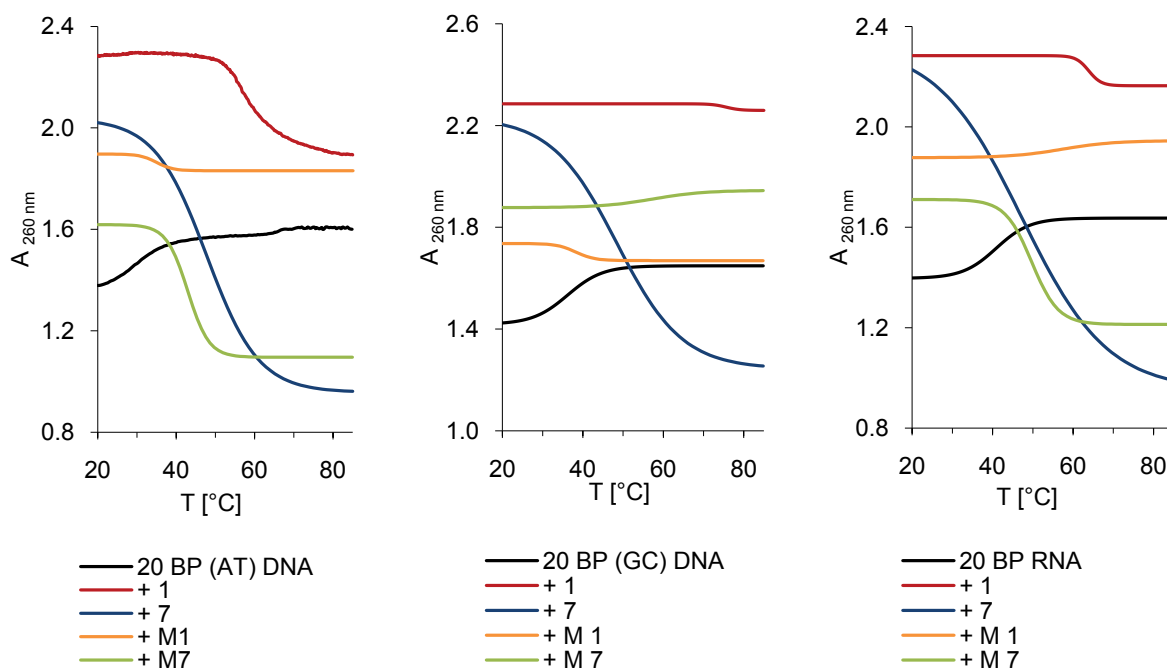


Abbildung 57: UV-Vis-Schmelzkurven von **1**, **7**, **M1** und **M7** mit 20 BP (AT) DNA (links), 20 BP (GC) DNA (mitte) und 20 BP RNA (rechts).

Tabelle 23: Die durch UV-Vis-spektroskopische Denaturierungsstudien erhaltenen T_m und ΔT_m -Werte für **1**, **7**, **M1** und **M7** mit 20 BP DNA- und RNA-Doppelsträngen.

Rezeptor	20 BP (AT) DNA*		20 BP (GC) DNA [#]		20 BP RNA ^a	
	T_m [$^{\circ}\text{C}$]	ΔT_m [$^{\circ}\text{C}$]	T_m [$^{\circ}\text{C}$]	ΔT_m [$^{\circ}\text{C}$]	T_m [$^{\circ}\text{C}$]	ΔT_m [$^{\circ}\text{C}$]
1	59	28	70	34	64	23
7	48	17	48	12	47	6
M1	35	4	38	2	57	16
M7	43	12	57	21	50	9

* T_m (20 BP (AT) DNA) = 31°C ; [#] T_m (20 BP (GC) DNA) = 36°C ; ^a T_m (20 BP RNA) = 41°C

Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass alle Dimere **1-7** DNA-, sowie auch RNA-Doppelstränge zu stabilisieren vermögen. Dabei hängt das Stabilisierungs-

verhalten von der Basensequenz der ausgewählten DNA-Doppelhelices ab. Während die ΔT_m -Werte für die 12 und 20 BP DNA ähnlich sind, zeigen sich zwischen den AT, GC und AU-Strängen zum Teil große Unterschiede. Das Guanidiniumderivat **7** vermag 12 und 20 BP DNA sehr stark zu stabilisieren. Für die AT und GC-Derivate werden dagegen halb so große ΔT_m -Werte erhalten, RNA wird nur schwach stabilisiert. Diese Ergebnisse korrelieren mit den erhaltenen Bindungskonstanten aus den Fluoreszenztitrationen. Auch dort wurde die größte Bindungskonstante von **7** mit der normalen 12 BP [FI]-DNA ermittelt.

Dimer **1** zeigt für alle eingesetzten DNA-Doppelstränge ähnliche ΔT_m -Werte, am besten kann die 20 BP (GC) DNA mit $\Delta T_m = 34^\circ\text{C}$ stabilisiert werden. Das Guanidinium-Monomer **M7** vermag die DNA-Doppelstränge gut zu stabilisieren, der Wert für die GC-DNA ist sogar doppelt so groß wie für das Guanidinium-Dimer **7**. Dagegen zeigt das Monomer **M1** für die DNA-Doppelstränge durchweg niedrigere Stabilisierungen. 20 BP DNA wird gar nicht stabilisiert. Erstaunlicherweise vermag das Monomer **M1** jedoch doppelsträngige RNA zu stabilisieren. Diese Ergebnisse korrelieren ebenfalls mit den erhaltenen Daten aus den Fluoreszenztitrationen: **M1** bildete mit RNA den stabilsten Komplex.

3.3.5 CD-Spektroskopie

Circulardichroismus (CD) ist eine sehr sensible Methode, um Konformationsänderungen der Sekundärstruktur von Polynucleotiden zu detektieren. Durch die Aufnahme von CD-Spektren sollten Informationen zur Konformationsänderung von B-DNA durch Bindung der Calixaren-Dimere und –Monomere und damit Hinweise auf den Bindungsmodus erhalten werden.

Die in der DNA UV-aktiven Chromophore sind die DNA-Basen A, T, G und C. Sie zeigen im Bereich von 190-300 nm mit einem Maximum bei 260 nm starke π - π^* -, sowie schwache n - π^* -Übergänge. Isolierte Purin- und Pyrimidinbasen sind planar, optisch inaktiv und zeigen kein CD-Signal. Da die Basen mit den asymmetrischen Zuckern Ribose bzw. Desoxyribose verknüpft sind, können die Zucker ein CD in dem UV-Absorptionsbereich der Basenchromophore hervorrufen.^[133] Die durch Basenstapelung ausgebildete helikale Sekundärstruktur der Doppelstrang-DNA bewirkt einen zusätzlichen CD-Beitrag durch die Kopplung der unmittelbar übereinander liegenden DNA-Basen. Das CD-Signal von Nucleinsäuren erhöht sich mit der Länge aufgrund der Kopplung der DNA-Basen durch ihre Basenstapelung in der DNA-Helix und hängt von der Basensequenz ab. Da die Kopplung der Basenabsorptionen abstands- und winkelabhängig ist, ergeben verschiedene DNA-Konformationen unterschiedliche CD-Spektren. In Abbildung 58 sind die CD-Spektren von A- und B-DNA dargestellt.

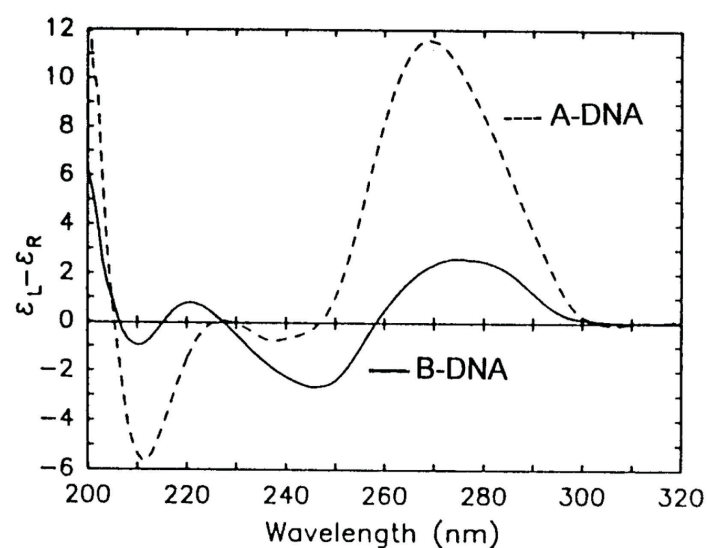


Abbildung 58: CD-Spektrum von DNA in der A- und B-Konformation.

B-DNA zeigt einen charakteristischen CD-Verlauf mit einer positiven Bande bei 280 nm, einem Nulldurchgang bei 260 nm und einem negativen Cotton-Effekt in einem Bereich von 240-250 nm. Während die positive Bande durch die Basenstapelung hervorgerufen wird, ist die negative Bande durch die helikale Konformation der DNA induziert. Im Gegensatz zu der B-DNA zeigt DNA in der A-Form ein stark positives Signal bei 260-270 nm und eine negative Bande bei 210 nm.

Viele Rückgratbinder sind dafür bekannt, die DNA-Konformation durch ihre Bindung zu deformieren, indem die Struktur der B-DNA in die der A-DNA übergeht.^[157]

DNA-bindende, achirale Substanzen, die interkalieren oder sich in eine der beiden Furchen einlagern, können einen induzierten CD (ICD) verursachen. Dieser entsteht durch eine nicht-degenerative Kopplung zwischen elektrischen Übergangsmomenten der Substanz mit denen der nächsten Basenpaare. Dabei kann jedes Basenpaar als einzelnes effektives Übergangsmoment repräsentiert werden. Wie in Kapitel 3.1.4 erwähnt, kann das Signal und die Größenordnung der ICD-Bande von der Bindungsgeometrie des Liganden an die DNA abhängen. Im Allgemeinen weist ein Interkalator ein schwaches und negatives ICD-Signal auf, wenn seine aromatischen Einheiten coplanar mit den Basenpaaren angeordnet sind (wenn sein Übergangsdipolmoment entlang der Längsachse der Bindungstasche (parallel) polarisiert ist). Andererseits ist die ICD-Bande positiv und relativ stark ausgeprägt, wenn das entsprechende Übergangsdipolmoment senkrecht zu dieser Achse steht. Furchenbinder zeigen in der Regel ebenfalls stark ausgeprägte positive ICD-Signale. Bei einer Bindung in der Furche ist der Ligand meist um 45° zur chiralen DNA-Achse orientiert und gibt eine stark positive ICD-Bande.^[131, 158, 159] Ein sichtbarer ICD legt eine Interkalation oder Furchenbindung nahe.^[135] Keine ICD-Bande könnte bedeuten, dass der Binder womöglich außerhalb der Furche positioniert ist.^[160]

Alle CD-Messungen wurden in 1 mM Hepes-Puffer mit 50% Methanol (pH 7.1) durchgeführt, mit einem Rezeptorüberschuss von 30 eq., wenn nicht anders vermerkt. Die jeweiligen CD-Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 200-400 nm aufgenommen.

Zuerst wurde ein CD-Spektrum von 12 BP DNA mit einer Konzentration von 1 µM in der gepufferten Wasser/Methanol 1:1-Lösung aufgenommen. Die DNA-Konformation ist abhängig vom Lösungsmittel und kann von der B-Form in eine andere Konformation übergehen. Unter den hier gewählten Bedingungen (gepufferte Wasser/Methanol-Lösung 1:1)

bleibt die B-Form der DNA allerdings erhalten.^[133] Das Maximum von 12 BP DNA liegt bei 277 nm, der negative Cotton-Effekt besitzt sein Minimum bei 242 nm und der Nulldurchgang ist bei einer Wellenlänge von 260 nm zu beobachten. Die hier untersuchten achiralen Dimere und Monomere zeigten, wie erwartet, keine CD-Aktivität.

Im Komplex mit 12 BP DNA wurden für die Calixaren-Dimere **1**, **5** und **6** bei 30 eq. Dimerenüberschuss starke Erhöhungen der Elliptizität beobachtet (Abbildung 59). Im Komplex mit den drei Dimeren wird das Maximum der DNA bei 277 nm auf 286 nm für Dimer **1**, 287 nm für Dimer **6** und 284 nm für Dimer **5** verschoben. Dabei sind die bei den Maxima erhaltenen Elliptizitäten mehr als doppelt so groß wie für den Doppelstrang alleine ($\theta_{\text{DNA}} = 2.5$ mdeg; $\theta_{\text{DNA+1}} = 11.1$ mdeg; $\theta_{\text{DNA+5}} = 6.1$ mdeg; $\theta_{\text{DNA+6}} = 6.3$ mdeg).

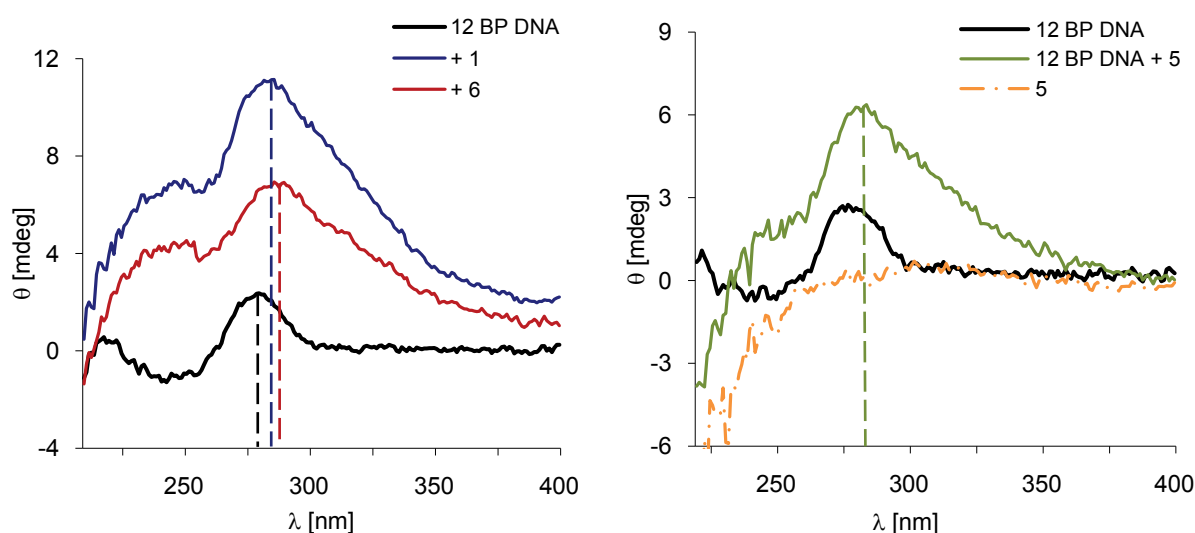


Abbildung 59: Links: CD-Spektren von 12 BP DNA mit und ohne Dimer **1** und **6** (im Komplex jeweils 30 eq. Dimer); rechts: CD-Spektren von 12 BP DNA mit und ohne Dimer **5** (jeweils 30 eq. Dimer).

Bei eingehender Betrachtung dieser Dimer-DNA-Komplexe konnte erkannt werden, dass es sich bei den Änderungen um induzierte CD-Signale handelt, die auf eine Bindung des Rezeptors in der großen Furche hinweisen. Die Beobachtung der positiven ICD-Signale bei 284-287 nm ist ein wichtiger Beweis für die Interaktion der Substanzen mit den Basenpaaren. Das ICD berücksichtigt die Interaktionen des Übergangsmomentes der Calixaren-Chromophore mit den Übergangsmomenten der umgebenden DNA-Basen.^[137]

Wegen der sehr hohen Konzentrationen der Dimere (30 eq., also 60 μM) liegen die Werte für die UV-Absorptionen im Bereich ab 250 nm zu hoch (überschreiten eine Absorption von 1.0).

Dadurch können die Veränderungen ab einer Wellenlänge von 250 nm nur unter Vorbehalt, und unter 225 nm nicht mehr in die Auswertung mit einbezogen werden. Die UV-Absorption darf für die Anfertigung von CD-Spektren weder zu hoch noch zu gering sein. Die optimale Probenabsorption liegt zwischen 0.6-1.0. Eine zu hohe Absorption impliziert einen Mangel an einfallendem Licht auf den Detektor und begünstigt Artefakte, während zu kleine Absorptionen das Grundrauschen wesentlich erhöhen.^[161] Dieser Effekt ist in Abbildung 59 gut an der aufgenommenen Kurve von Dimer **5** zu beobachten. Ab einer Wellenlänge von 250 nm wird die Elliptizität plötzlich stark erniedrigt, während sie vorher konstant bei einem Wert von 0 lag. Die CD-Spektren lassen sich also erst ab einem Wellenlängenbereich von 250 nm auswerten; für den Wellenlängenbereich zwischen 200 nm und 250 nm können keine Aussagen getroffen werden. Die scheinbar positive Bande im Wellenlängenbereich von 240-250 nm für die DNA-Dimer-Komplexe kann nicht in die Beurteilung der Konformation mit einfließen. Um ein aussagekräftiges CD-Spektrum zu erhalten, konnte die DNA-Konzentration nicht niedriger als 1 μ M gewählt werden.

Um einen Zusammenhang zwischen der Rezeptorkonzentration und einer Änderung im CD-Spektrum zu erhalten, wurden CD-Spektren von 12 BP DNA mit unterschiedlichen Äquivalenten an Dimer **1** aufgenommen (Abbildung 60). Dabei zeigte sich schnell, dass erst ab einer Zugabe von mehr als 20 eq. Dimer **1** zur DNA eine signifikante Änderung im CD-Spektrum zu beobachten ist. Unter 20 eq. Dimer bleibt die Konformation der B-DNA komplett erhalten. Erst ab 25 eq. Dimer **1** erscheint das positiv induzierte CD-Signal bei 286 nm. Scheinbar hängen die aus den Fluoreszenztitrationen erhaltenen Komplexstöchiometrien mit dem Bindungsmodus bzw. der Orientierung der Dimere an die DNA zusammen. Bei 20 eq. Dimer **1** wird in der Bindungsisotherme aus der Fluoreszenztitration mit 12 BP DNA der Sättigungsbereich erreicht. Das weist auf eine mögliche Änderung der Orientierung der Dimere an die DNA bei Sättigung hin.

Die Aufnahme der CD-Spektren für die Dimere **2**, **3** und **4** mit 12 BP DNA zeigte keine induzierten CD-Signale im Bereich von 280 nm (Abbildung 60). Das Maximum der Doppelstrang-DNA bei 277 nm wurde in den Komplexen mit den Dimeren geringfügig erniedrigt. Die Maxima der DNA-Dimer-Komplexe sind nur sehr geringfügig auf 279 nm (von 277 nm) verschoben. Der starke Abfall der Elliptizität ab 260 nm ist auf die zu hohe Konzentration der Dimere zurückzuführen. Die fehlenden induzierten CD-Signale mit den Dimeren **2-4** weisen auf eine andere Geometrie der Dimer-DNA-Komplexe von **2-4**, als von den Dimeren **1**, **5** und **6** hin.

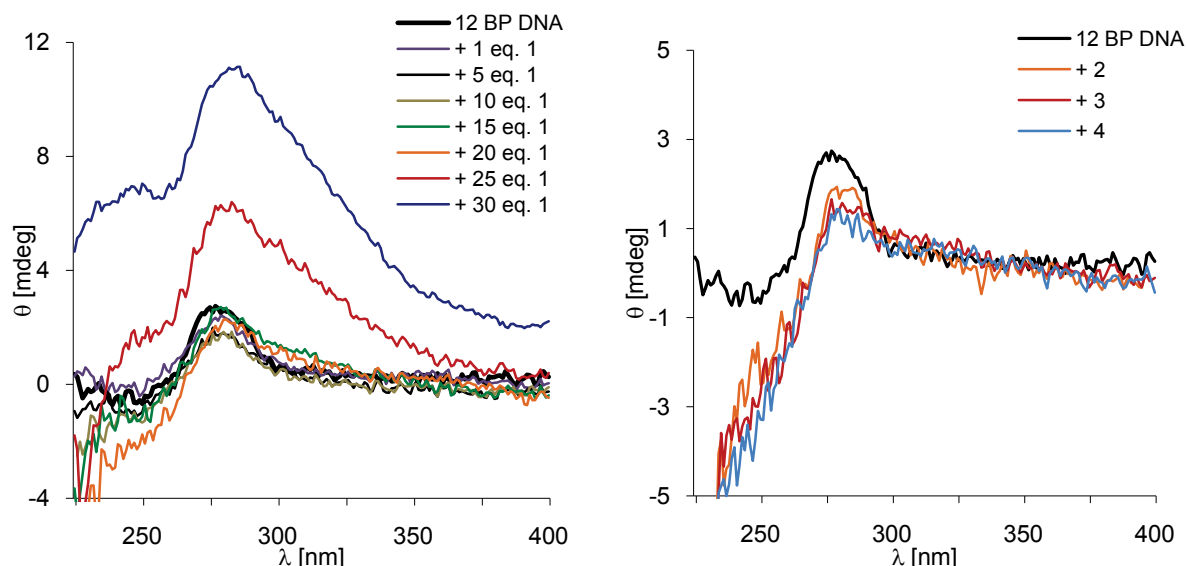


Abbildung 60: Links: Konzentrationsabhängige CD-Spektren des Komplexes von 12 BP DNA und Dimer 1; rechts: CD-Spektren der DNA-Komplexe mit Dimer 2, 3 und 4.

In dem aufgenommenen CD-Spektrum des Dimers 7 mit 12 BP DNA wird das Maximum auf 287 nm verschoben und erhöht, was wiederum auf einen positiv induzierten CD hindeutet (Abbildung 61). Dieser Effekt ist allerdings schwächer ausgeprägt als für das Dimer 1.

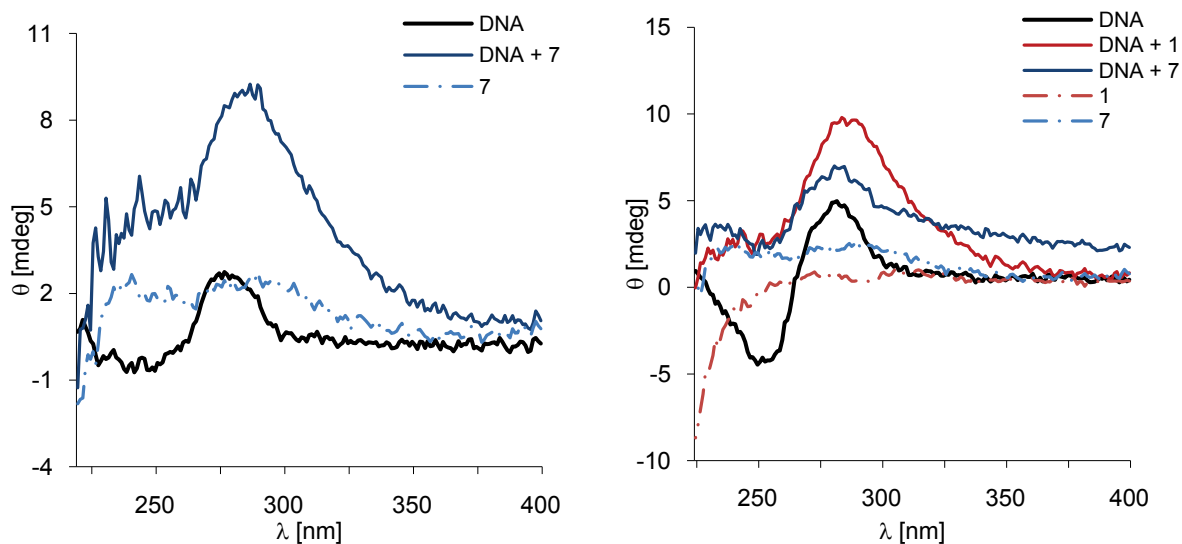


Abbildung 61: Links: CD-Spektren von Dimer 7 mit und ohne 12 BP DNA; rechts: CD-Spektren von Dimer 1 und 7 mit 20 BP DNA

Für die Dimere 1 und 7 wurde jeweils noch ein CD-Spektrum mit 20 BP DNA aufgenommen. Das CD-Spektrum von 20 BP DNA zeigt eine positive Bande mit Maximum bei 282 nm, einen Nulldurchgang bei 262 nm, sowie einen negativen Cotton-Effekt mit Minimum bei

250 nm. Im Komplex mit Dimer **1** wurde das Maximum wieder stark erhöht und zu höheren Wellenlängen verschoben (289 nm), was wieder auf ein positiv induziertes CD-Signal hinweist. Dagegen wurde im DNA-Komplex mit dem Guanidiniumdimer **7** ebenfalls eine Erhöhung der positiven Bande beobachtet, die jedoch nicht mit einer Verschiebung des Maximums begleitet wird. Die Änderung der positiven DNA-Bande bei $\lambda = 280$ nm ohne induziertes CD-Signal kann dabei auf eine Änderung in der Sekundärstruktur der DNA-Helix hinweisen.

Zuletzt wurden CD-Spektren der DNA-Monomer-Komplexe aufgenommen (Abbildung 62). Beide Monomere sind, ebenso wie die Dimere, nicht CD-aktiv. Durch Zugabe von 30 eq. **M1** zu 12 BP DNA ändert sich das CD-Spektrum. Die positive Bande mit dem Maximum bei 277 nm wird fast bis auf 0 erniedrigt. Diese Beobachtung geht sicherlich mit einer Änderung der DNA-Konformation einher. Währenddessen zeigt **M7** ein positiv induziertes CD-Signal mit einem Maximum bei 290 nm. Die für die Monomerkomplexe aufgenommenen CD-Spektren lassen eine unterschiedliche Anordnung der beiden Monomere an die DNA vermuten.

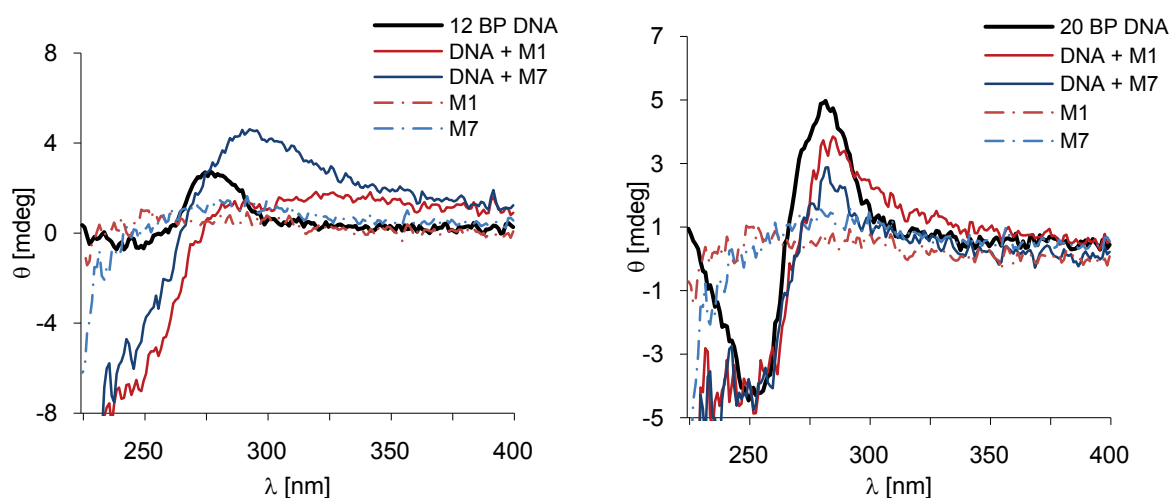


Abbildung 62: CD-Spektren der Monomere **M1** und **M7** mit 12 BP DNA (links) und 20 BP DNA (rechts).

Mit 20 BP DNA reagieren beide Monomere ähnlich: Das Maximum der positiven Bande bei 282 nm wird durch Zugabe der Monomere erniedrigt. Dieser Effekt wurde auch schon für die Dimere **2**, **3** und **4** beobachtet. Wahrscheinlich sind diese Substanzen im DNA-Komplex anders ausgerichtet als die Dimere, die stark positiv induzierte CD-Signale zeigen. Die induzierten CD-Signale scheinen wiederum stark abhängig von den eingesetzten Äquivalenten an Dimer zu sein, wie für das Dimer **1** gezeigt werden konnte. Vielleicht ist

dieser Effekt von dem verwendeten Lösungsmittelgemisch abhängig. Die ICD-Signale legen eine Furchenbindung nahe, auch wird die Konformation der B-DNA nicht geändert. Denkbar ist in diesem Zusammenhang auch ein gemischter Bindungsmodus. Wie genau die Dimere jedoch zu den DNA-Basen ausgerichtet sind, kann aus den hier erhaltenen Ergebnissen noch nicht eindeutig aufgeklärt werden.

Die von *W. Hu* untersuchten Dimere **A** und **B** zeigen mit 12 und 20 BP DNA ebenfalls positiv induzierte CD-Signale, die auch schon durch Zugabe von 1.3 eq. Dimer sichtbar werden.^[151] Diese Eigenschaft erlaubt es, Aussagen für das gesamte CD-Spektrum, auch für den kurzwelligen Bereich, zu treffen und CD-Titrationen mit den jeweiligen Dimeren durchzuführen.

3.3.6 Molecular Modelling

Mit dem Programm *MacroModel 9.0*^[162] wurden Kraftfeldrechnungen mit Dimer-DNA-Komplexen *in silico* durchgeführt, um mögliche Wechselwirkungen der Calixarene mit Doppelstrang-DNA zu simulieren.

MacroModel verwendet eine idealisierte B-DNA-Konformation, die durch das Programm generiert werden kann. Die Calixarene wurden so vororientiert, dass sie in der großen Furche möglichst viele Wasserstoffbrückenbindungen zu den DNA-Basen eingehen. Die Komplexstrukturen wurden in Wasser in dem sogenannten Kontinuumsmodell mit dem Kraftfeld OPLS minimiert. Die abgebildeten Strukturen sind die besten Strukturen aus einer Monte-Carlo Simulation. Dabei wurden die jeweiligen Ausgangsstrukturen zunächst minimiert und dann eine Monte-Carlo Simulation von 1000 unterschiedlichen Startstrukturen mit jeweils 1000 Schritten durchlaufen. Bei diesen Simulationen wurde die DNA nicht durch sogenannte constraints festgehalten, sondern war frei beweglich. Zu den jeweiligen Minimumstrukturen werden keine Energien angegeben, da die größten Energiebeiträge für die Solvation und die DNA-Bewegung erhalten wurden.

Die berechneten Molekülstrukturen zeigen eine mögliche Anordnung und Orientierung der Calixarene mit doppelsträngiger DNA. Wasserstoffbrücken-Kontakte und elektrostatische Wechselwirkungen der Calixarene mit DNA werden simuliert. Durch diese Rechnungen können also mögliche Komplexstrukturen erhalten werden.

Abbildung 63 zeigt die Calixarendimere **1**, **6** und **7** mit 20 BP DNA in der Gesamtansicht.

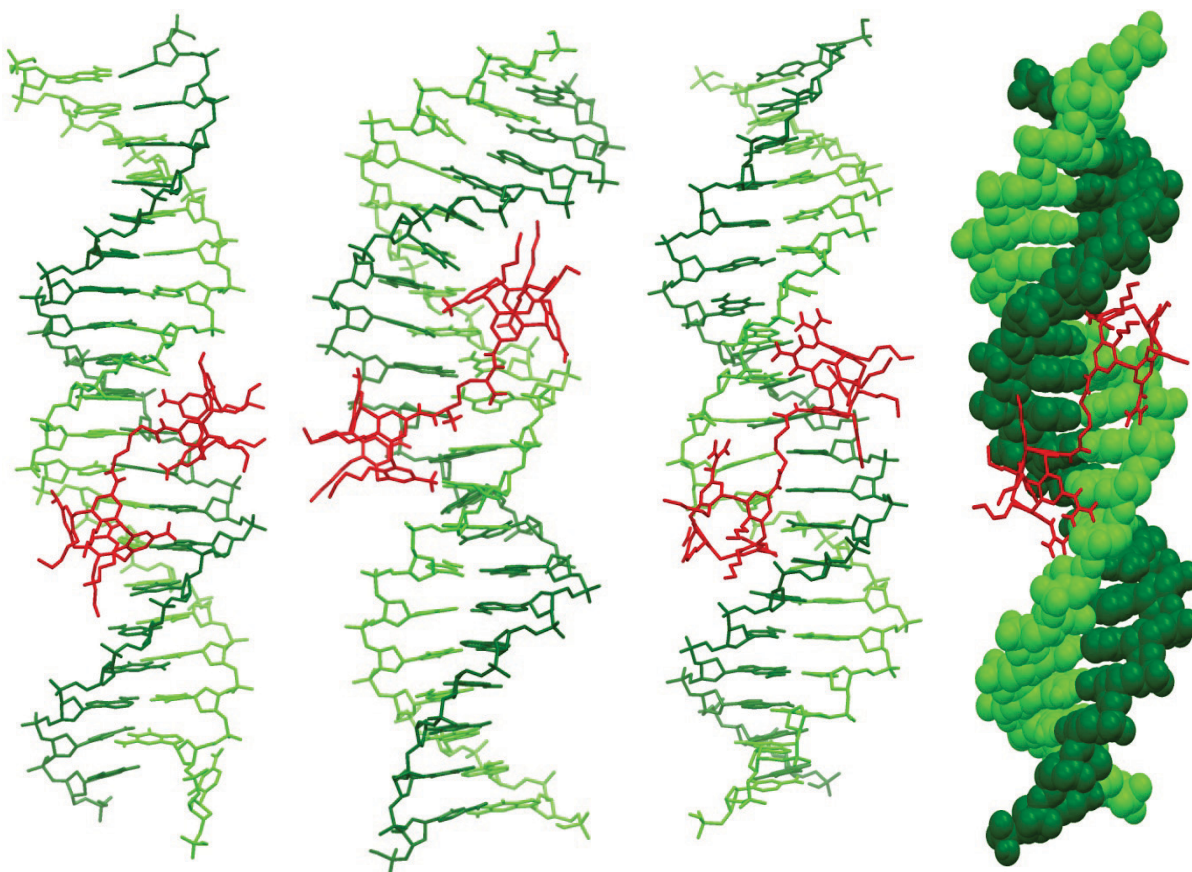


Abbildung 63: Die in einer Monte-Carlo Simulation (MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 1000 Schritte) ermittelten Minimumstrukturen der 20 BP DNA-Komplexe mit Dimer **1** (links), **6** (2. v. links) und **7** (rechts und 2. v. rechts); grün: DNA-Doppelstränge; rot: Dimere.

Die Dimere können sich optimal in der großen Furche der DNA einlagern. Dabei sind die funktionellen Gruppen am oberen Rand der Calixarenhalbschalen zu den DNA-Basen in der Furche orientiert, während die Butoxygruppen nach außen zeigen. In Abbildung 64 sind Ausschnitte aus den Minimumstrukturen der Dimere **1**, **6** und **7** mit 20 BP DNA dargestellt. Diese zeigen, dass die Dimere mit ihren Amino- bzw. Guanidiniumgruppen sowohl Wasserstoffbrückenbindungen mit den DNA-Basen, als auch Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat eingehen können. Da die Calixaren-Dimere fast nur Wasserstoffbrückendonatoren besitzen (N-H), und nur zwei Carbonylgruppen im Spacer enthalten, die als Wasserstoff-

brückenakzeptoren fungieren können ($C=O$), werden zum größten Teil Wasserstoffbrückenakzeptoren der DNA-Basen erkannt.

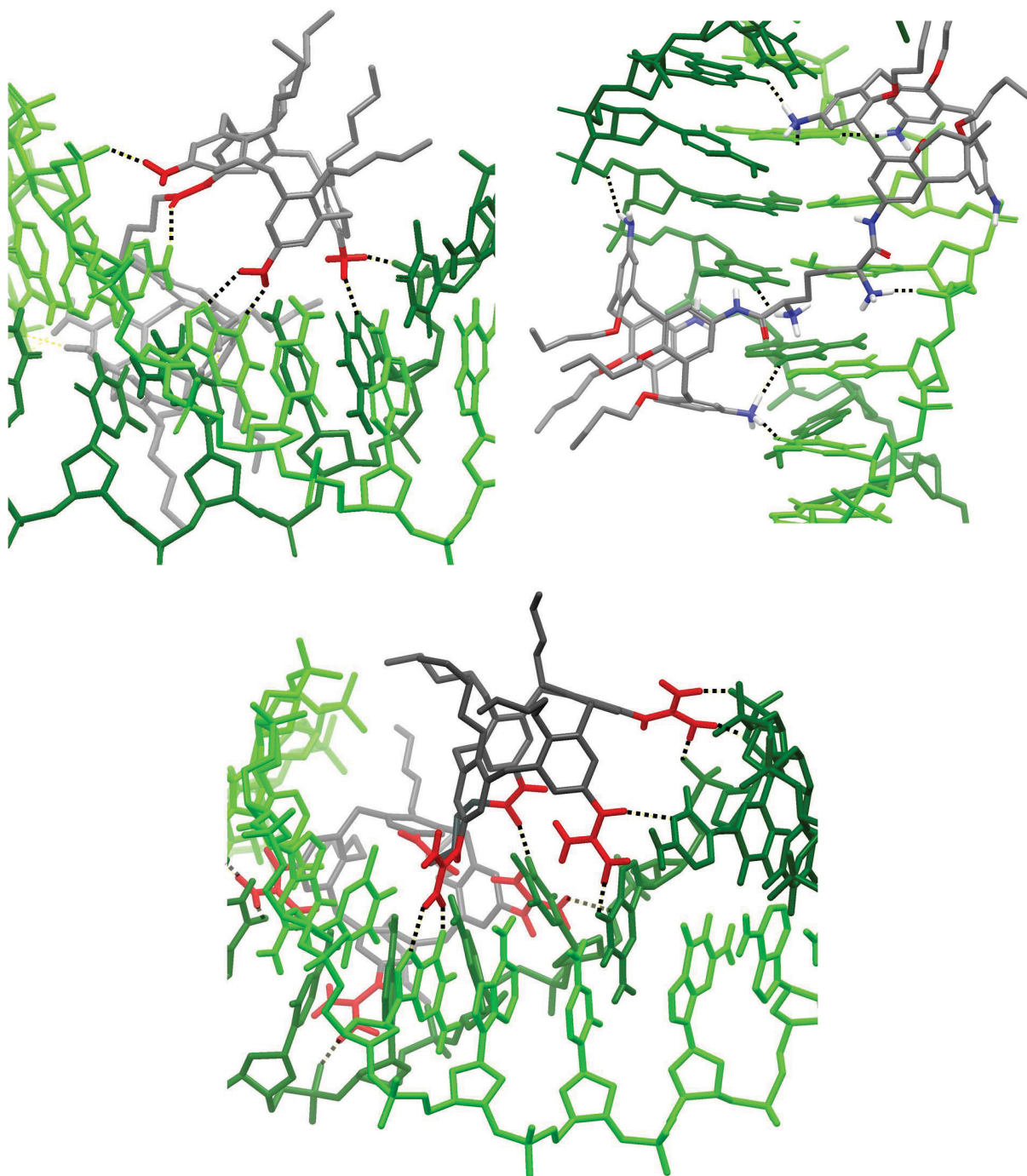


Abbildung 64: Ausschnitte aus den in einer Monte-Carlo Simulation (MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 1000 Schritte) ermittelten Minimumstrukturen der 20 BP DNA-Komplexe mit Dimer 1 (oben links), 6 (oben rechts) und 7 (unten); grün: DNA-Doppelstränge; Dimere 1 und 7 in grau, mit rot eingefärbten Anilin- bzw. Guanidiniumgruppen.

Dimer 1 geht mit seinen Anilingruppen sowohl Wasserstoffbrückenbindungen zu den Basenpaaren ein, als auch Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat. In der Minimum-

struktur von Dimer **6** mit 20 BP DNA gehen die Ammoniumgruppen des Spacers, wie erwartet, zusätzliche Wechselwirkungen mit der DNA ein. In der hier gezeigten Struktur bildet eine Ammoniumgruppe eine Wasserstoffbrücke zu einer DNA-Base aus, während die andere mit dem Rückgrat wechselwirkt. Sehr schön erkennbar ist, dass das Dimer **7** mit seinen Guanidiniumgruppen bidentale Wechselwirkungen mit den DNA-Basen in der großen Furche, sowie mit dem Phosphatrückgrat, eingeht, was für die große ermittelte Komplexstabilität verantwortlich sein dürfte. Durch die Beschaffenheit der Guanidiniumgruppen kann mit einer Calixarenhalbschale theoretisch ein Bereich von vier aufeinander folgenden Basenpaaren erkannt werden (Abbildung 64).

Um bevorzugte Wechselwirkungen mit den verschiedenen DNA-Basen zu untersuchen, wurden auch Kraftfeldrechnungen der Dimere **1** und **7** mit AT- und GC-reicher DNA durchgeführt (Abbildungen 65-66).

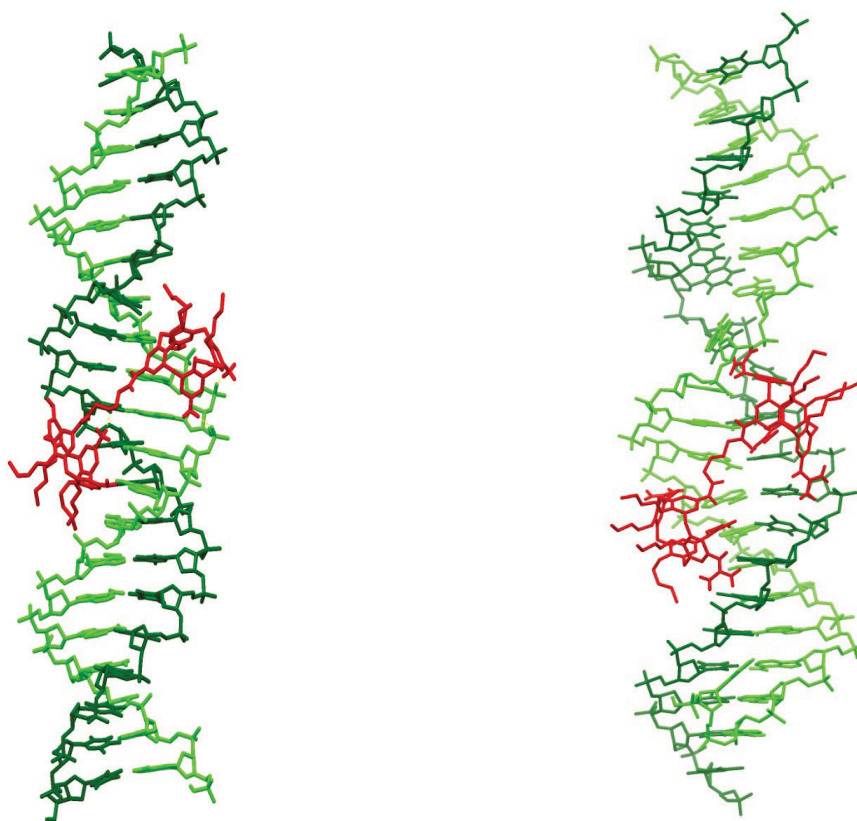


Abbildung 65: Die in einer Monte-Carlo Simulation (MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 1000 Schritte) ermittelten Minimumstrukturen der 20 BP(AT) DNA-Komplexe mit Dimer **1** (links) und **7** (rechts); grün: DNA-Doppelstränge; rot: Dimere.

In einer AT-DNA bilden die Dimere **1** und **7** bevorzugt Wechselwirkungen mit dem Carbonylkohlenstoffatom O4 des Thymins und dem Stickstoff N7 des Adenins aus.

Zusätzlich sind mit dem Amid-Sauerstoffatom der Spacereinheit Wasserstoffbrücken zu der Aminogruppe des Adenins an N6 möglich. Beide Dimere bilden auch mit AT-reicher DNA Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat aus.

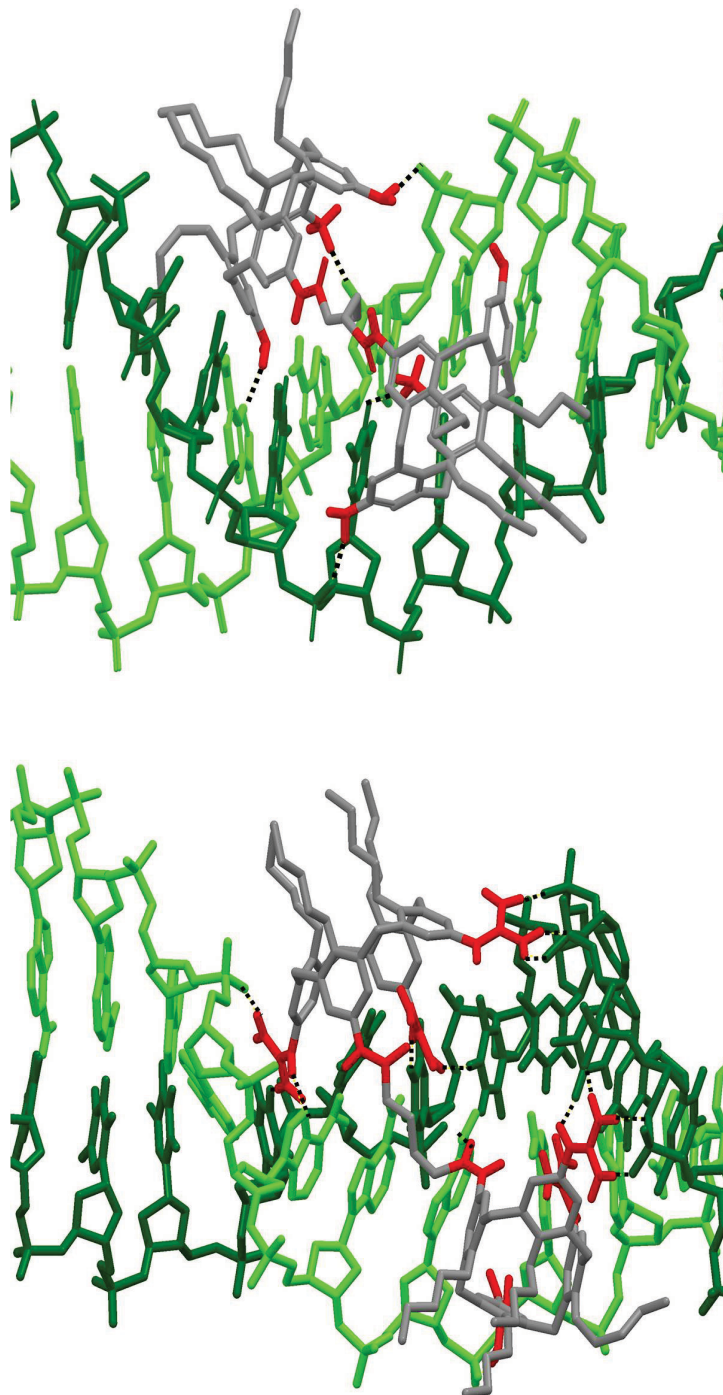


Abbildung 66: Ausschnitte aus den in einer Monte-Carlo Simulation (MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 1000 Schritte) ermittelten Minimumstrukturen der 20 BP (AT) DNA-Komplexe mit Dimer 1 (oben) und 7 (unten); grün: DNA-Doppelstränge; Dimere 1 und 7 in grau, mit rot eingefärbten Anilin- bzw. Guanidiniumgruppen.

Dimer **7** kann durch seine Guanidiniumgruppen tief in die große Furche der DNA eintauchen. Dort sind bidentale Wechselwirkungen einer Guanidiniumgruppe mit zwei aufeinanderfolgenden Basen (z.B. O4 des Thymins), sowie Kontakte mit zwei schräg gegenüberliegenden Basen (A und T) möglich. Auch ist die Guanidiniumgruppe in der Lage, gleichzeitig Kontakte zu einer DNA-Base und dem Phosphatrückgrat einzugehen. Die bidentalen Wechselwirkungen der Guanidiniumgruppe werden auch von der Aminosäure Arg bei der DNA-Erkennung mittels Transkriptionsfaktoren beobachtet.^[9]

In den Abbildungen 67 und 68 sind die Minimumstrukturen der Dimere **1** und **7** mit GC-reicher DNA, die mögliche Kontakte zu den Basen simulieren, dargestellt.

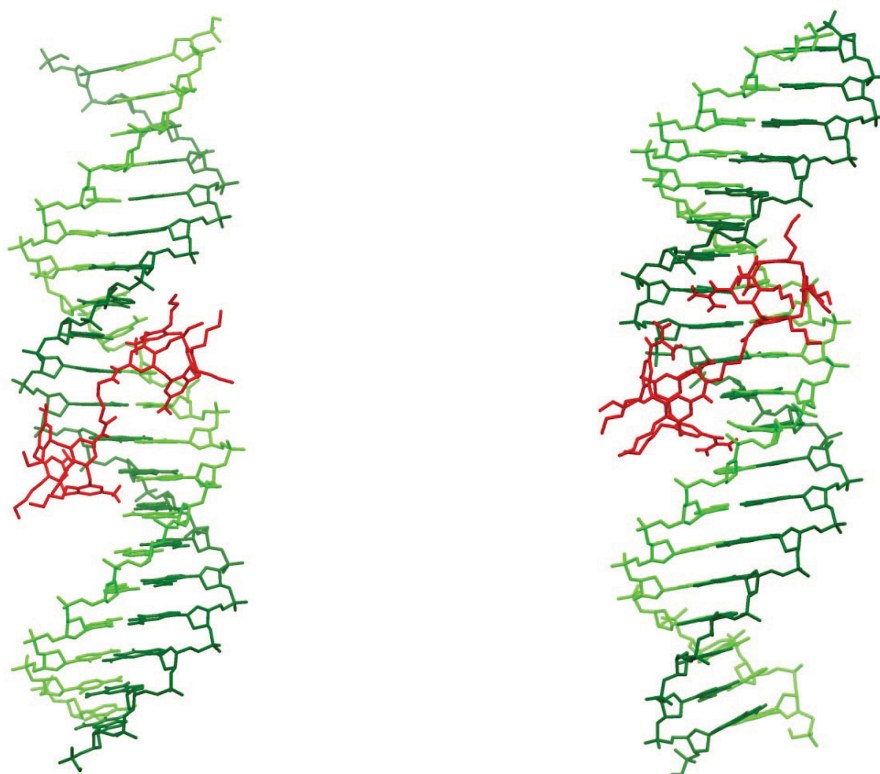


Abbildung 67: Die in einer Monte-Carlo Simulation (MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 1000 Schritte) ermittelten Minimumstrukturen der 20 BP(GC) DNA-Komplexe mit Dimer **1** (links) und **7** (rechts); grün: DNA-Doppelstränge; rot: Dimere.

Mit GC-reicher Doppelstrang-DNA werden bevorzugt Wechselwirkungen der Dimere zum Carbonylkohlenstoffatom O6 und Stickstoff N7 des Guanins, sowie zum Stickstoffatom N3 des Cytosins eingegangen. Daneben werden abermals zahlreiche Wechselwirkungen zum Phosphatrückgrat ausgebildet.

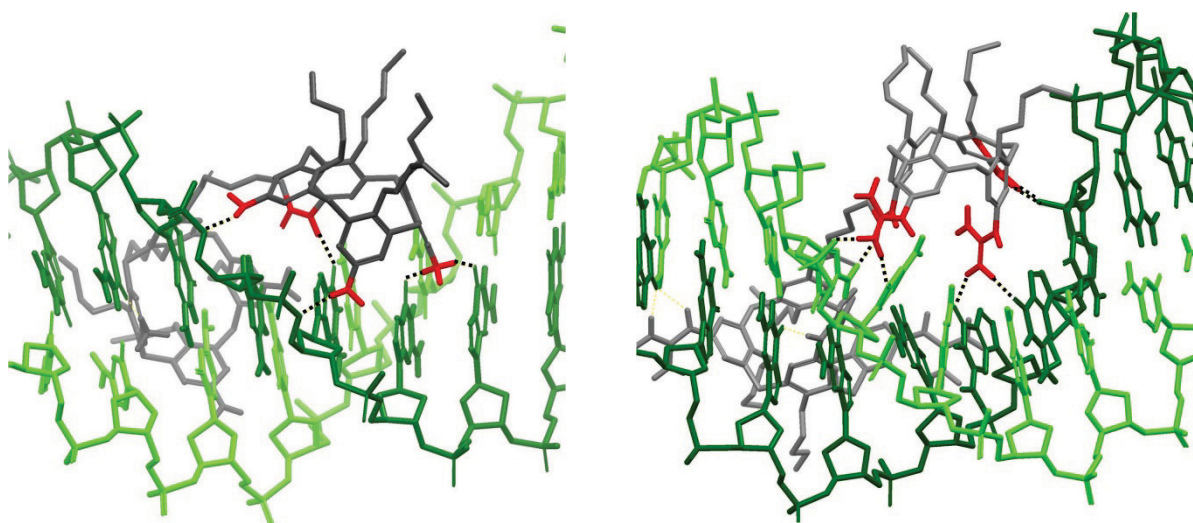


Abbildung 68: Ausschnitte aus den in einer Monte-Carlo Simulation (MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 1000 Schritte) ermittelten Minimumstrukturen der 20 BP (GC) DNA-Komplexe mit Dimer **1** (links) und **7** (rechts); grün: DNA-Doppelstränge; Dimere **1** und **7** in grau, mit rot eingefärbten Anilin- bzw. Guanidiniumgruppen.

Für die Monomere **M1** und **M7** wurden ebenfalls Monte-Carlo Simulationen mit DNA durchgeführt (Abbildungen 69-70).

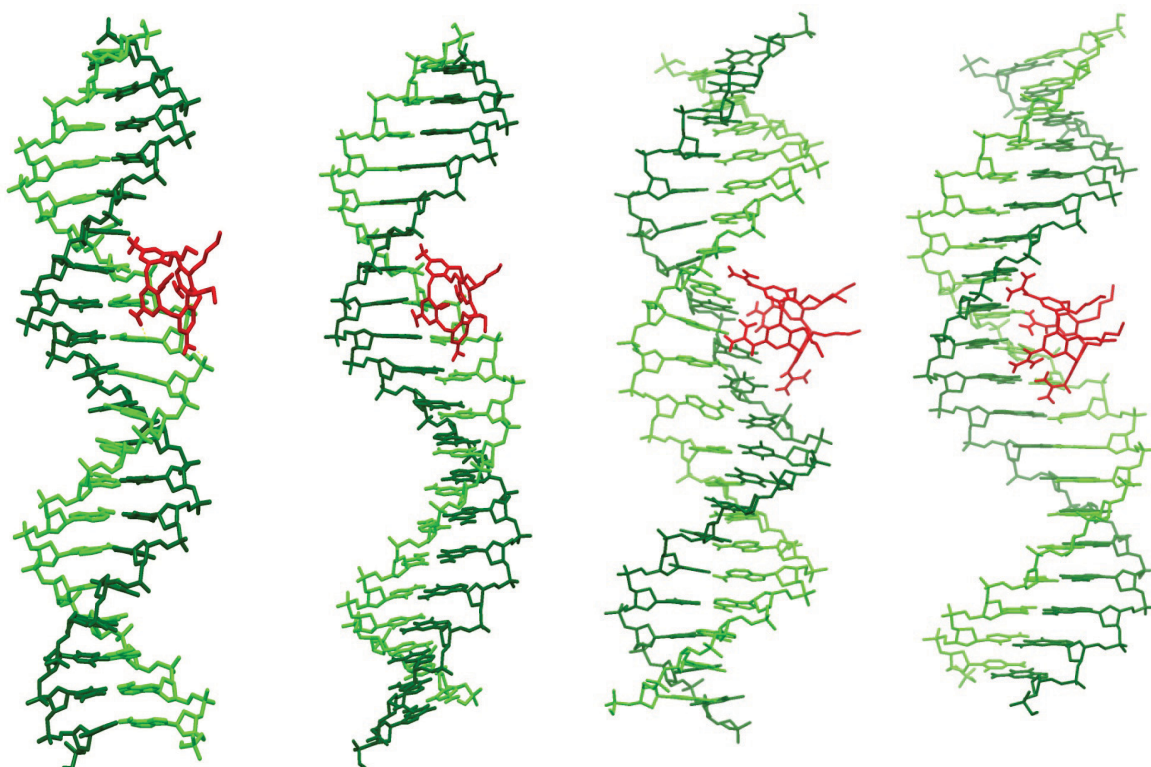


Abbildung 69: Die in einer Monte-Carlo Simulation (MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 1000 Schritte) ermittelten Minimumstrukturen der DNA-Monomer-Komplexe. Links: **M1** mit AT-DNA; 2.v. links: **M1** mit GC-DNA; 2.v.rechts: **M7** mit AT-DNA; rechts: **M7** mit GC-DNA; grün: DNA-Doppelstränge; rot: Dimere.

Eine bevorzugte Bindung der Monomere in der großen Furche ist aufgrund ihrer Größe durchaus denkbar und könnte wie in Abbildung 70 gezeigt aussehen.

Die beiden Monomere können mit ihren Anilin- bzw. Guanidiniumgruppen, wie die Dimere, ebenfalls Wechselwirkungen mit den Basenpaaren in der großen Furche eingehen. Allerdings konnte keine Minimumstruktur gefunden werden, in der alle vier funktionellen Gruppen der Monomere **M1** und **M7** an den Wechselwirkungen beteiligt sind.

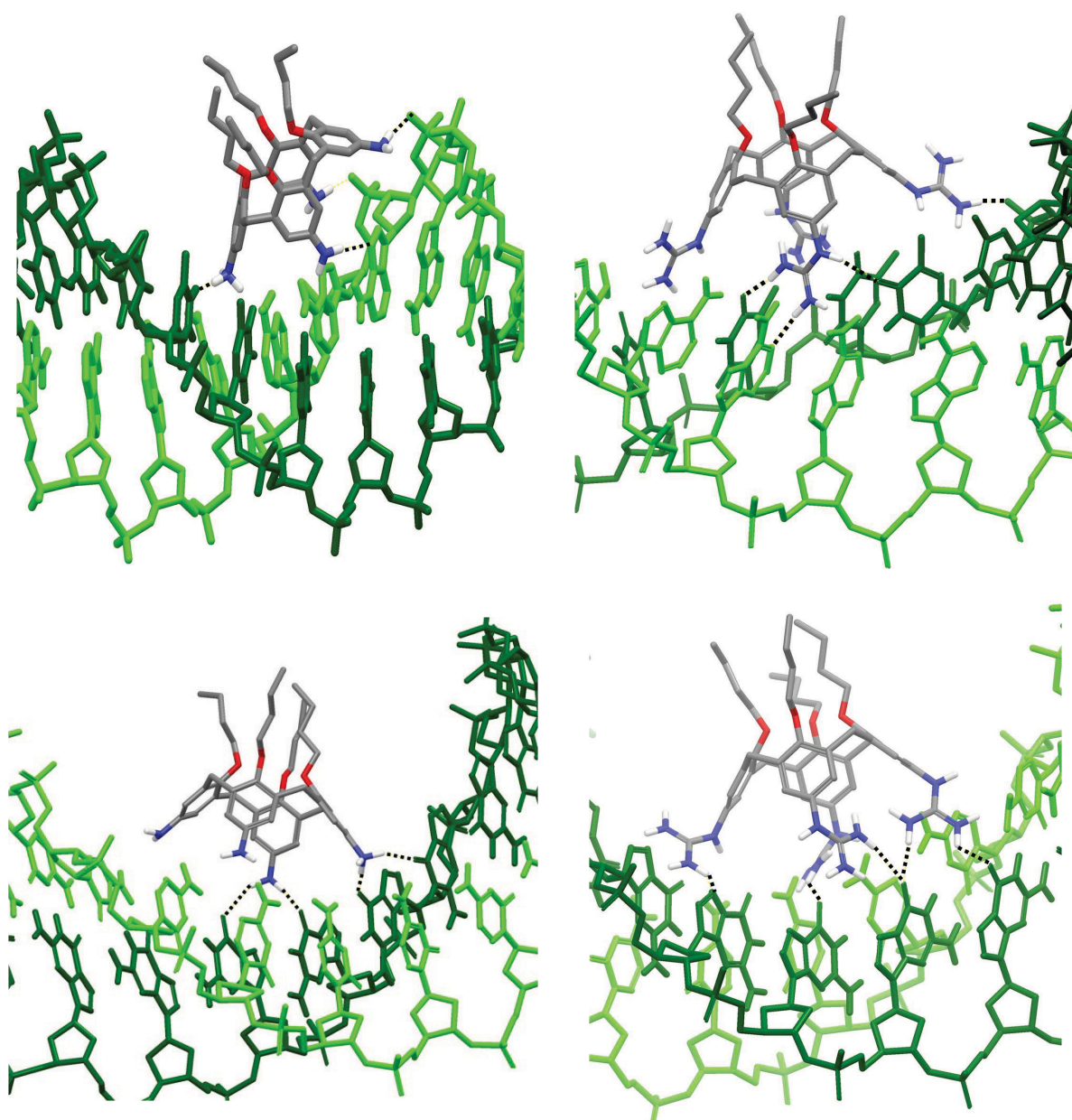


Abbildung 70: Ausschnitte aus den in einer Monte-Carlo Simulation (MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 1000 Schritte) ermittelten Minimumstrukturen der DNA-Monomer-Komplexe. Oben: **M1**; unten **M7**; links: 20 BP (AT) DNA; rechts: 20 BP (GC) DNA; grün: DNA-Doppelstränge.

Die berechneten Modellstrukturen geben keine plausible Erklärung für die hohen Komplexstöchiometrien. Die Monomere sind von kleinerer Größe, so dass mehr Moleküle benötigt werden, um die große Furche abzusättigen. Die Dimere füllen die große Furche allerdings schon sehr gut aus. Zusätzlich zu der Bindung in der großen Furche müssen auch weitere Bindungsarten in Betracht gezogen werden, wie z.B. die Bindung ans Phosphatrückgrat. Desweiteren müsste geklärt werden, ob die Calixarene aggregieren und wie diese Aggregate dann mit der DNA wechselwirken. Die hier gezeigten Strukturen sind also höchstwahrscheinlich eine starke Vereinfachung der realen Gegebenheiten. Allerdings zeigen die Minimumstrukturen, neben den Ergebnissen aus den Bindungsstudien, dass eine Bindung, besonders der Dimere in der großen Furche sehr wahrscheinlich ist, und auf dem Grund der Furche eine Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden können.

3.3.7 ¹H-NMR-Studien mit dem Dickerson-Dodecamer und Dimer 1

Zur Aufklärung der Struktur des DNA-Dimer-Komplexes sollten ¹H-NMR-Experimente durchgeführt werden. Als DNA-Doppelhelix sollte das bekannte Dickerson-Dodecamer, von dem die NMR-Struktur in Wasser vollständig aufgeklärt ist, verwendet werden.^[163-165] Das Dickerson-Dodecamer ist selbstkomplementär mit der Basensequenz 5'-CGC GAA TTC GCG-3', und kann eine B-DNA ausbilden.^[166, 167] Zunächst sollte *W. Hu* sein wasserlösliches Dimer **A** in Kooperation mit *H. Ihmels*, Universität Siegen, mit dem Dickerson-Dodecamer in wässriger Lösung untersuchen. Schnell zeigte sich jedoch, dass der Dimer-DNA-Komplex im NMR-Röhrchen ausfällt. Auch durch Herabsetzung der Konzentrationen von 2 mM auf 0.1 mM, sowie die Verwendung verschiedener Lösungsmittel-Zusammensetzungen führte nicht zum Erfolg. Es konnten keine Bedingungen gefunden werden, unter denen der Dimer-DNA-Komplex hinreichend löslich ist.^[151]

Aus diesem Grund wurde versucht, eine ¹H-NMR-Struktur mit dem Dimer **1** und dem Dickerson-Dodecamer zu erhalten. Die Konzentration von Dimer und DNA sollte jeweils

0.1 mM sein. Es zeigte sich, dass unter Verwendung von gepufferten oder nicht-gepufferten MeOH- d_4 /H₂O 1:1-Mischungen der DNA-Rezeptor-Komplex sofort ausfiel, und eine Messung unter diesen Umständen nicht durchgeführt werden konnte. Durch den Einsatz von MeOH- d_4 /D₂O 9:1 konnte schließlich eine scheinbar klare Lösung hergestellt werden. Dazu wurde die benötigte Menge an Dimer in MeOH- d_4 gelöst und langsam mit einer Lösung von DNA in D₂O tropfenweise versetzt.

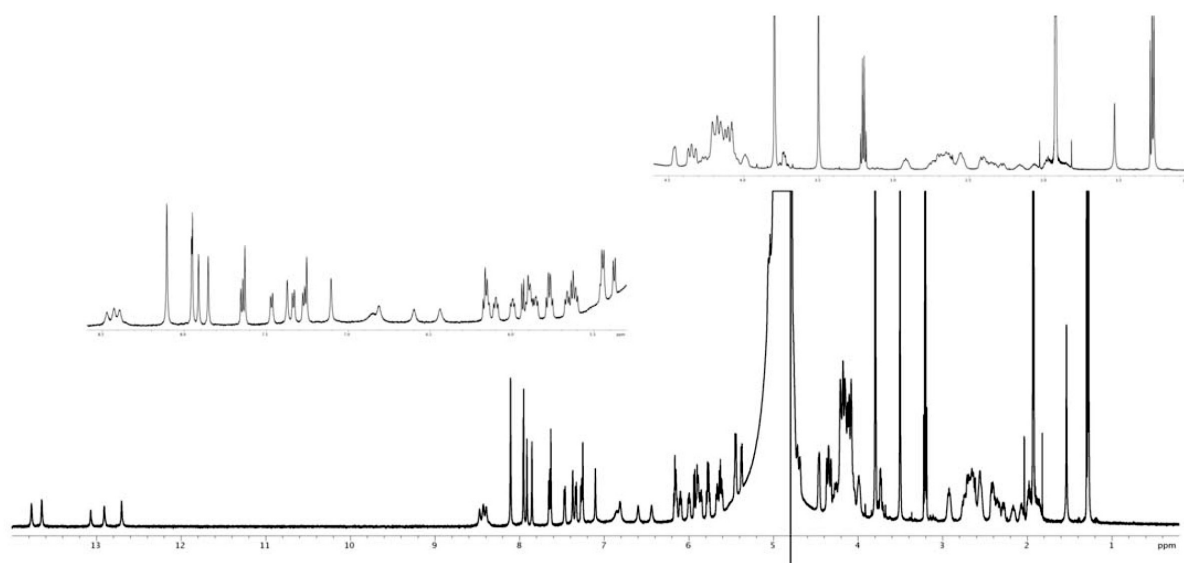


Abbildung 71: ^1H -NMR-Spektrum des Dickerson-Dodecamers (CGCGAATTCGCG), 2 mM in D₂O/H₂O 1:9 mit Natriumphosphatpuffer (pH 7), mit Wasserunterdrückung bei 25°C. Aufgenommen von der Arbeitsgruppe H. Ihmels, Universität Siegen.

Zuvor wurde ein ^1H -NMR-Spektrum von 0.1 mM DNA in dem Lösungsmittel MeOH- d_4 /D₂O 9:1 aufgenommen. Dieses unterscheidet sich stark von dem DNA-Spektrum in gepuffertem Wasser (Abbildung 71). Die Signale sind teilweise verschoben, verbreitert und fallen zusammen, so dass keine Zuordnung erfolgen kann. Darüberhinaus sind durch das gewählte Lösungsmittelgemisch die N-H-Protonen der DNA-Basen nicht mehr sichtbar, da die Protonen unter den Bedingungen mit dem deuterierten Lösungsmittel austauschen.

Das Dimer lässt sich als 0.1 mM Lösung ohne Probleme in der MeOH- d_4 /D₂O 9:1-Mischung lösen. In dem aufgenommenen ^1H -NMR-Spektrum sind alle Protonensignale des Dimers scharf und können zugeordnet werden (Abbildung 72).

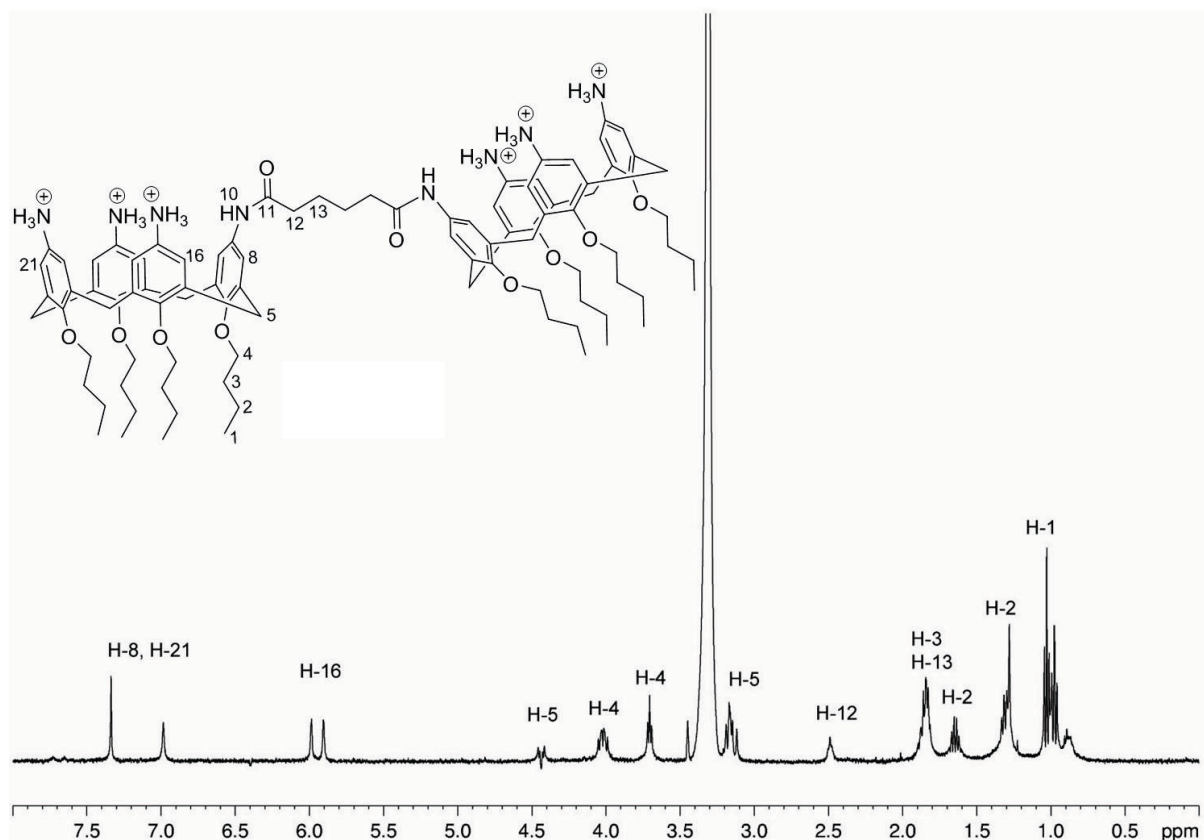


Abbildung 72: ^1H -NMR-Spektrum von Dimer **1** in $\text{MeOH-}d_4/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 bei 25°C .

Betrachtet man die Protonensignale des Dimers **1** in dem ^1H -NMR-Spektrum des Dimer-DNA 1:1-Komplexes, fällt auf, dass nur noch das Methylprotonensignal der Butoxygruppe bei $\delta = 1.00$ ppm scharf ist (Abbildung 73). Im Bereich von $\delta = 1.00$ - 1.84 ppm sind die CH_2 -Protonensignale der Butoxygruppen noch zu erkennen, wobei sie etwas verschoben und verbreitert vorliegen. Die Aromatenprotonen des Dimers fehlen in dem Spektrum vollständig. Wahrscheinlich sind die Signale stark verbreitert und verschoben. Es lässt sich aber nicht ausmachen, wohin und wie stark. Bei Vergleich des DNA-Spektrums mit dem DNA-Dimer-Spektrum lässt sich feststellen, dass auch die DNA-Signale etwas verschoben sind. Da die Signale in dem gewählten Lösungsmittel aber nicht zuzuordnen sind, kann diesbezüglich keine Aussage getroffen werden. Die offensichtliche Verbreiterung der Aromatenprotonen des Dimers weist allerdings auf eine Interaktion des Calixarens mit der DNA hin. Wenn auch nicht festgestellt werden kann, wo genau diese Wechselwirkungen an der DNA stattfinden, kann doch eine Aussage zu der Lage des Rezeptors gemacht werden. Da die Butylgruppen kaum verschoben sind, und die Methylprotonen noch scharf sichtbar sind, wird ein Bindungsmodus nahegelegt, in dem die Butylgruppen in die Lösung hinausragen, während

die Anilingroupen des Dimers zur DNA hinzeigen. Bei Bindung in der großen Furche würde genau diese Anordnung auftreten.

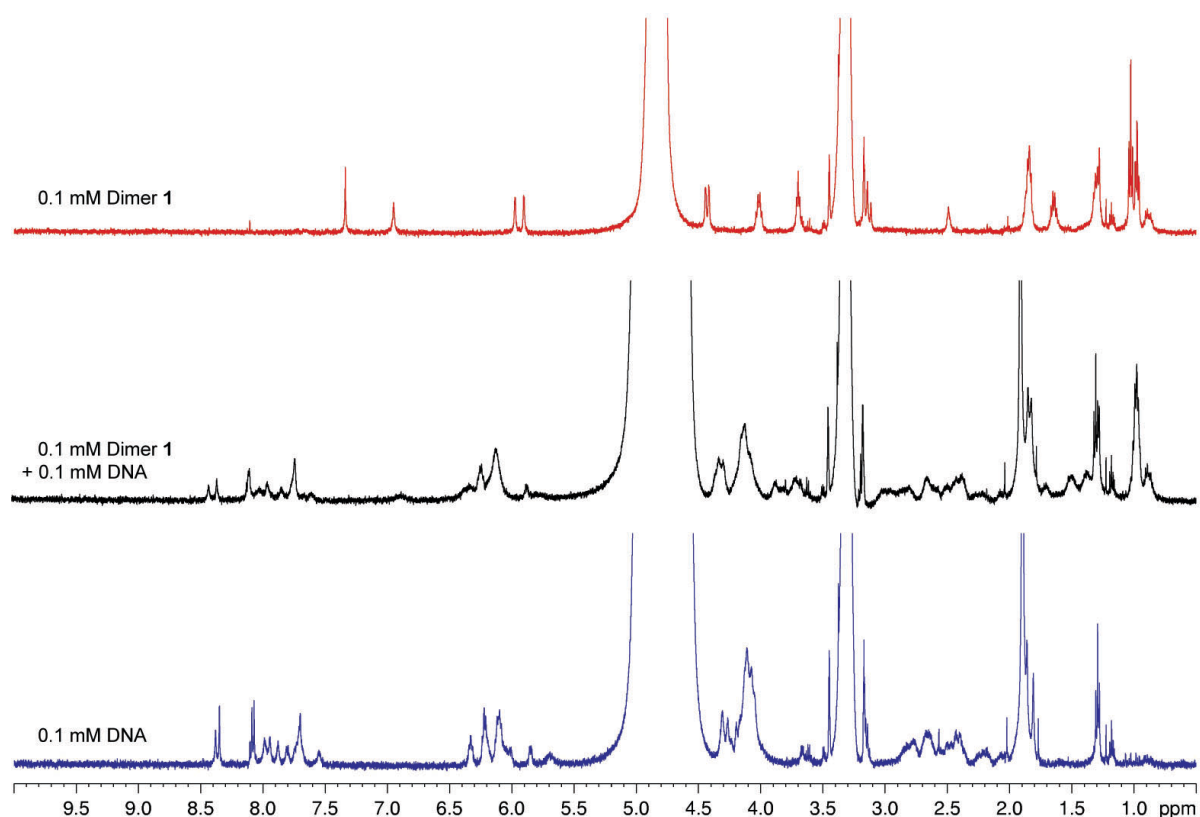


Abbildung 73: ^1H -NMR-Spektren in $\text{MeOH-}d_4/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 bei 25°C. Oben: 0.1 mM Dimer 1; Mitte: 0.1 mM Dimer 1 und 0.1 mM Dickerson-Dodecamer; Unten: 0.1 mM Dickerson-Dodecamer.

Durch ^1H -NMR-Titrationen mit dem Dickerson-Dodecamer und dem Dimer 1 sollte nun festgestellt werden, wie die aromatischen Protonen des Calixarens verschoben werden. Dazu wurde eine 0.1 mM Dimer-Lösung in $\text{MeOH-}d_4/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 hergestellt, zu der in kleinen Schritten die DNA, gelöst in demselben Lösungsmittel, zupipettiert werden sollte, bis ein Dimer-DNA 1:1-Komplex vorliegt. Schon nach der ersten Zugabe von DNA (0.1 eq.) wurde die Lösung im NMR-Röhrchen leicht trübe, und nach Zugabe eines weiteren Aliquotes DNA (0.2 eq) war die Lösung stark getrübt.

Nach nochmaliger Betrachtung des NMR-Röhrchens der zuvor gemessenen Dimer/DNA 1:1-Lösung konnte auch eine leichte Trübung festgestellt werden, die vor der Messung noch nicht sichtbar war. Diese Probe wurde zum Test in der gleichen Zusammensetzung erneut vorbereitet. Diesmal war eine leichte Trübung sofort sichtbar. Fraglich ist, ob in der scheinbar

klaren 1:1-Lösung der DNA/Dimer-Komplex ebenfalls fein verteilt ausgefällt wurde und zunächst nicht sichtbar war.

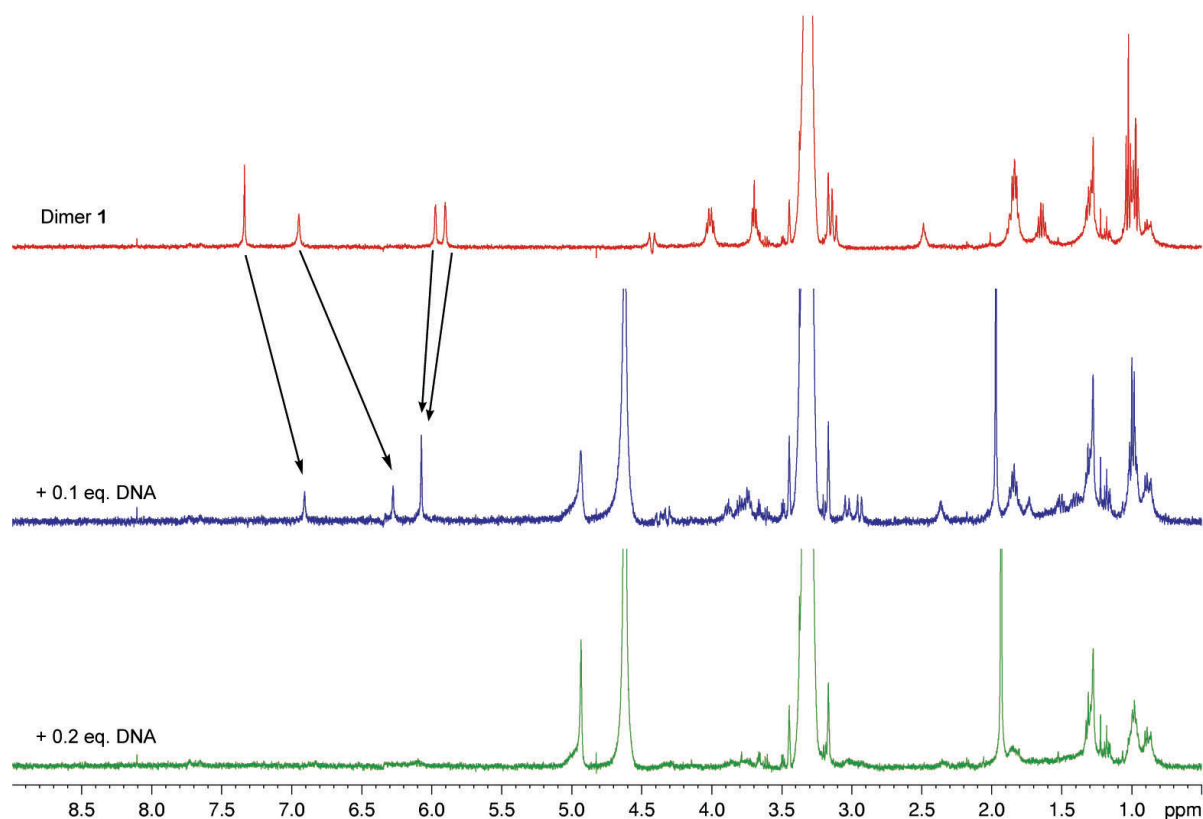


Abbildung 74: ^1H -NMR-Spektren in $\text{MeOH-}d_4/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 bei 25°C. Oben: 0.1 mM Dimer 1; Mitte: 0.1 mM Dimer 1 mit 0.1 eq. Dickerson-Dodecamer; Unten: 0.1 mM Dimer 1 mit 0.2 eq. Dickerson-Dodecamer.

Bei Betrachtung des ^1H -NMR-Spektrums von Dimer 1 mit 0.1 eq. DNA (Abbildung 74, Mitte) fallen die stark verschobenen, noch scharfen aromatischen Protonensignale sofort ins Auge. Auch im Bereich von 3.1 ppm-4.4 ppm sind die Signale der Methylenprotonen, sowie der OCH_2 -Protonen der Butoxygruppe etwas verschoben und verbreitert. Die Methylen- und Methylprotonensignale im Bereich von 1.0 ppm-1.8 ppm sind dagegen scharf und kaum verändert. In dem ^1H -NMR-Spektrum des Dimers mit 0.2 eq. DNA sind nur noch die Methyl- (H-1) und die Methylenprotonen (H-2) der Butoxygruppen scharf sichtbar, während alle anderen Signale stark verbreitert und nicht mehr detektierbar sind. Auch diese Beobachtung weist wieder auf eine Lage des Dimers mit den Anilingroupen in Richtung DNA und den Butoxygruppen in die Lösung hin. Allerdings kann das Spektrum mit 0.2 eq. DNA aufgrund der trüben Lösung nur unter Vorbehalt ausgewertet werden, da die Homogenität im Magnetfeld bei trüben Lösungen nicht mehr gegeben ist. Da sich die aromatischen Protonen-

signale zwischen 0 eq. und 0.1 eq. DNA-Zugabe stark verändern, sollte nochmal eine NMR-Titration in diesem Bereich durchgeführt werden.

Es konnte schon in den Fluoreszenztitrationen gezeigt werden, dass die Komplexstöchiometrien der Anilindimere mit DNA sehr hoch sind. Da nur die Rezeptorsignale untersucht werden sollten, konnten die bisher verwendeten Konzentrationen beibehalten werden.

Abbildung 75 zeigt die aufgenommenen ^1H -NMR-Spektren der Titration von DNA zu Dimer **1**. Ab einer Zugabe von 0.10 eq. DNA wurde eine beginnende Trübung der Lösung beobachtet, die bei 0.12 eq. und 0.13 eq. leicht ausgeprägt war. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Titration an dieser Stelle beendet. Im Anfangsbereich der Titration können Aussagen getroffen werden, da die Lösung homogen vorliegt. Der Äquivalenzpunkt scheint bei einer Zugabe von 0.08 eq. DNA zu liegen, was mit den erhaltenen Komplexstöchiometrien aus den Fluoreszenztitrationen übereinkommt. Bei diesem Verhältnis ist die DNA mit Calixaren abgesättigt.

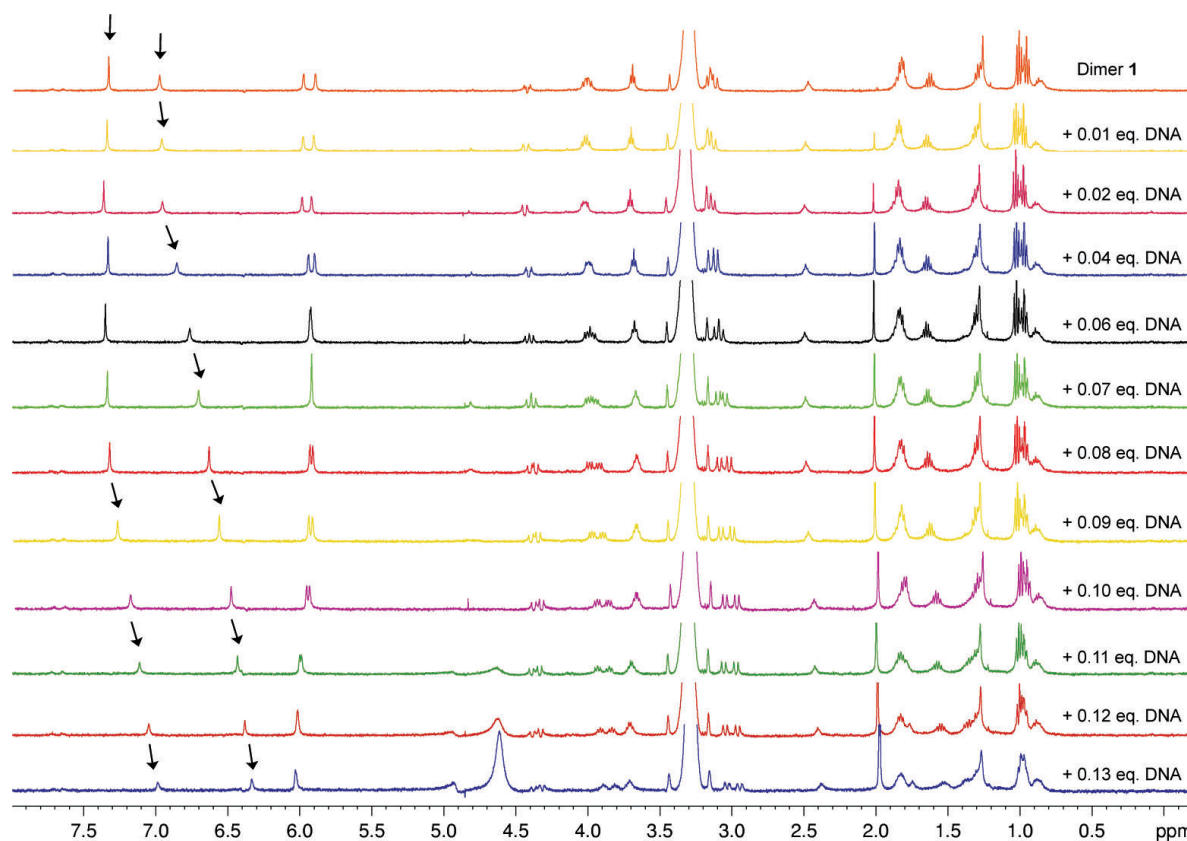


Abbildung 75: ^1H -NMR-Spektren der Titration von Dickerson-Dodecamer zu Dimer **1** in $\text{MeOH-}d_4/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 bei 25°C mit Wasserunterdrückung.

Anhand der Spektren ist sehr gut erkennbar, dass bis zu einer Konzentration von 0.08 eq. DNA das aromatische Protonensignal bei 6.9 ppm (wahrscheinlich H-21) um 0.6 ppm stark hochfeldverschoben wird, während das andere Protonensignal bei 7.3 ppm (wahrscheinlich H-8) bis 0.08 eq. DNA kaum verschoben wird, und erst ab 0.08 eq. zu shiften beginnt. Die anderen beiden aromatischen Protonensignale bei 6.0 ppm und 5.9 ppm (H-16) shiften nicht stark. Während die beiden Signale bis 0.07 eq. durch Hochfeldverschiebung des linken Signals zusammenfallen, werden sie ab 0.08 eq leicht tieffeldverschoben. In Abbildung 76 ist der aromatische Bereich aus der Titration vergrößert abgebildet.

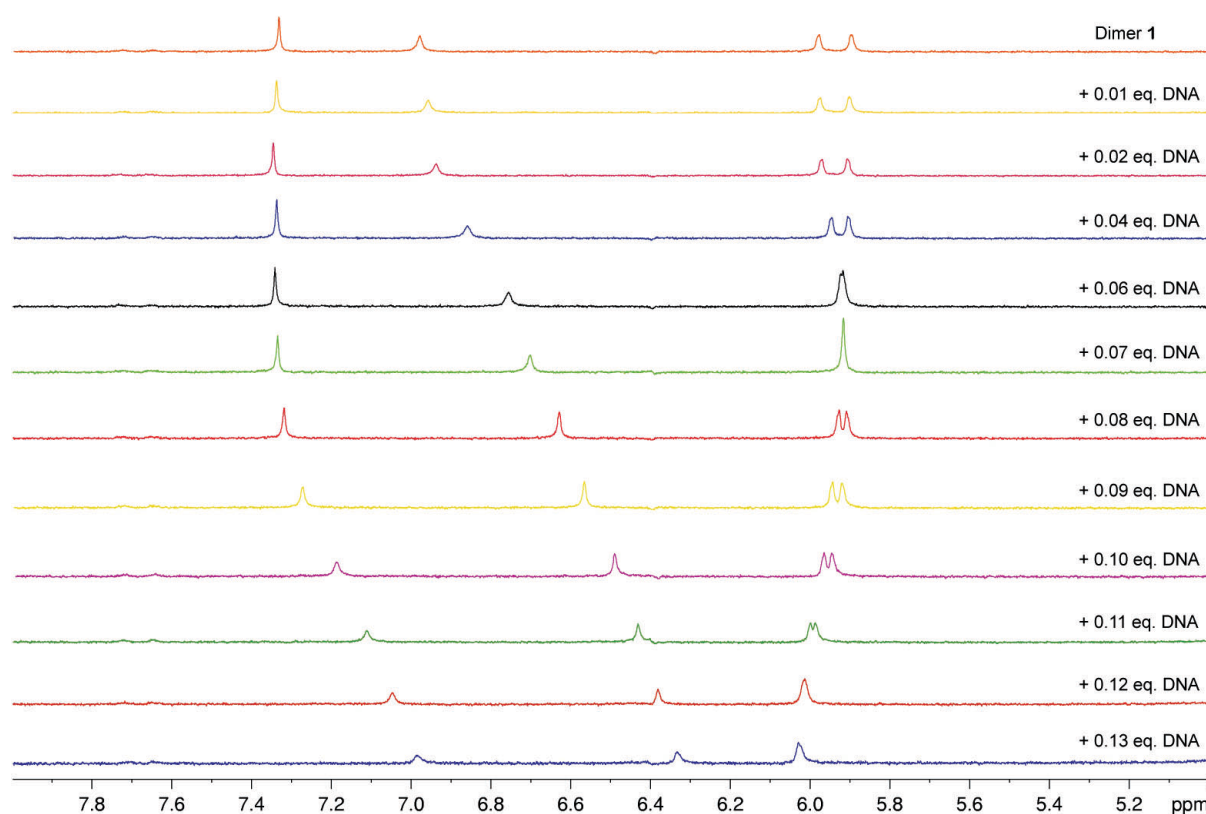


Abbildung 76: Ausschnitt aus den ^1H -NMR-Spektren der Titration von Dickerson-Dodecamer zu Dimer 1 in $\text{MeOH-d}_4/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 bei 25°C mit Wasserunterdrückung.

Auffällig ist, dass die Protonen der Butoxygruppe im Bereich von 1.0 ppm-1.8 ppm kaum verschoben werden. Im Bereich von 3.1 ppm-4.4 ppm kann eine geringe Verschiebung der Methylenprotonen, sowie der OCH_2 -Protonen beobachtet werden. Das Methylenprotonensignal bei 3.1 ppm wird dabei um $\Delta\delta = 0.1$ ppm verschoben und im Laufe der Titration in zwei Signale (zwei Dubletts) aufgespalten, während das am stärksten shiftende aromatische Proton um $\Delta\delta = 0.6$ ppm verschoben wird. Eine Aussage zu den Methylenprotonen bei 4.4 ppm kann nur bedingt gemacht werden, da in diesem Bereich durch die Wasser-

unterdrückung Artefakte entstehen. Auch das OCH_2 -Signal bei 4.0 ppm wird leicht verschoben und in zwei Signale aufgespalten. Die Signalaufspaltungen der Methylenprotonen können auf eine Änderung der chemischen Umgebung oder der Konformation des Calixarens durch Bindung an die DNA zurückzuführen sein.

Aus diesen Spektren lässt sich eine klare Aussage treffen. Die chemische Umgebung wird durch die räumliche Nähe der DNA (eventuell durch Wasserstoffbrückenbindungen) verändert. Das Calixaren-Dimer ist so zur DNA orientiert, dass es mit den Anilinfunktionen mit der DNA (in der großen Furche) in Wechselwirkung tritt, während die Butoxygruppen an der Interaktion nicht beteiligt sind (und aus der Furche herausragen). Dies kann eindeutig dadurch belegt werden, dass die aromatischen Protonen am stärksten verschoben sind, während die Methylen- und OCH_2 -Protonen etwas shiften und die übrigen Butoxyprotonen fast nicht. Das Methylprotonensignal bleibt als einziges Dimersignal selbst in einem Dimer-DNA 1:1-Komplex scharf.

3.3.8 Weiterführende Untersuchungen

3.3.8.1 Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)

Die Gelpermeationschromatographie,^[23, 168] in der Biochemie häufig auch unter dem Begriff „Gelfiltration“ geläufig, ist eine Methode zur Trennung, Reinigung und Charakterisierung von (Makro-)Molekülen, insbesondere von Proteinen und Proteinkomplexen. Die Trennung bei der GPC erfolgt nach der Größe der Moleküle in Lösung (nach ihrem hydrodynamischen Volumen). Die Trennsäule besteht aus hochvernetzten Polymerkügelchen mit einem Durchmesser von 5-15 μm . Während kleine Moleküle in die Poren dieser Kügelchen diffundieren und ihre Elution dadurch verzögert wird, können größere Moleküle nicht mit diesen Partikeln wechselwirken und werden zuerst eluiert.

Das Verhältnis von Molekulargewicht und hydrodynamischem Volumen hängt stark von der Form und der molekularen Dichte der Moleküle ab. Mit der Gel-Permeations-Chromatographie lassen sich relative Molekulargewichte anhand des Retentionsvolumens bestimmen, indem eine Kalibrierkurve unter Verwendung von Standards mit bekannter Molmasse erstellt wird.

Die aus der Fluoreszenztitration ermittelten hohen Stöchiometrien für die DNA-Dimer-Komplexe lassen eine Aggregation der Calixaren-Dimere vor oder während der Annäherung an die DNA-Helix vermuten. Diese Aggregation sollte durch GPC mit den Dimeren untersucht werden. Als Lösungsmittel wurde Wasser/Methanol 1:1 verwendet. Die GPC-Untersuchung zeigte, dass unter den gewählten Bedingungen keine Aggregate, sondern nur die monomeren Calixarene vorliegen. Damit kann eine Aggregatbildung vor der Einlagerung der Dimere in die DNA in dem verwendeten Lösungsmittel ausgeschlossen werden. Wenn eine Aggregation stattfindet, wird sie durch den Bindungsprozess induziert. Eine Analyse eines Calixaren-Dimer-DNA-Komplexes durch GPC-Analyse scheiterte daran, dass der Komplex unter den verwendeten Konzentrationen in dem Medium präzipitierte.

3.3.8.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auch versucht, ITC-Messungen von Dimer **1** mit DNA durchzuführen. Die isotherme Titrationskalorimetrie ist eine Technik zur Bestimmung von thermodynamischen Parametern von Bindungsprozessen. Durch ITC-Messungen sollte ein Hinweis auf den Bindungsmodus des Dimers an die DNA erhalten werden. Kleine Furche-Binder zeigen einen endothermen Verlauf, ΔH besitzt immer einen positiven Wert ($+\Delta H$), während die Enthalpie für die Bindung in der großen Furche grundsätzlich negativ ist und einen exothermen Verlauf ($-\Delta H$) zeigt. Die freie Gibbs'sche Energie ΔG dagegen bleibt für beide Vorgänge gleich.^[169, 170] Aus den Werten der Enthalpien ergibt sich für kleine- und große-Furche-Binder ein jeweils unterschiedlicher entropischer Beitrag. Dieser ist für eine

Bindung in der kleinen Furche signifikant größer ($+\Delta S$) als für eine Bindung in der großen Furche ($\pm\Delta S$, meist kleine negative Entropien).^[169]

Für die ITC-Messungen wurden 200 μM Dimer-Lösung und 10 μM DNA-Lösung in Wasser/Methanol 1:1 (Hepes-Puffer) angesetzt. Die DNA-Lösung wurde vorgelegt und die Dimerlösung hinzupipettiert. Eine Auswertung der resultierenden Enthalpiediagramme war leider nicht möglich, da nur ein Streufeld von Punkten aufgenommen wurde, und keine Tendenz erkennbar war. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine aufgetretene Trübung von wahrscheinlich ausgefallenem DNA-Rezeptor-Komplex bei den verwendeten Konzentrationen. Daher konnten ITC-Messungen nicht für eine Ermittlung des Bindungsmodus durchgeführt werden.

3.3.8.3 Kristallisationsversuche

Durch Aufnahme einer Kristallstruktur eines Dimer-DNA-Komplexes würde der Bindungsmodus eindeutig aufgeklärt werden. Zu diesem Zweck sollte versucht werden Dimer-DNA-Kristalle zu züchten. Dazu wurden die Proben von *J. Polkowska* in Essen und in Kooperation mit dem Arbeitskreis *T. Carell* in München vorbereitet.

Aufgrund der benötigten hochkonzentrierten Proben (1 mM DNA, 10 mM Dimer) konnten keine klaren DNA-Dimer-Lösungen erhalten werden. Nach Zugabe von DNA zu Dimer **1** ist sofort ein weißer Feststoff ausgefallen, auch unter vorheriger Lösung des Dimers in Methanol. Dadurch musste auf eine Weiterverfolgung dieser Methode verzichtet werden.

3.3.7 Untersuchung von **1**, **4** und **M1** auf ihren antiproliferativen Effekt gegenüber Tumorzelllinien

In Kooperation mit *I. Piantanida* (Division of Organic Chemistry and Biochemistry), sowie *M. Kralj* und *L. Šuman* (Division of Molecular Medicine) vom Ruder Bošković Institut, Zagreb, Kroatien, wurde untersucht, wie die Calixarene **1**, **4** und **M1** auf die Zellproliferation von verschiedenen menschlichen Tumorzelllinien einwirken.^[171]

Eine Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung allen Lebens ist die Vermehrung von Zellen durch Zellteilung. Eine fehlerhafte Regulation der Zellteilung kann beim Menschen zu verschiedenen hyper- oder hypoproliferativen Erkrankungen führen, wie z.B. der Entstehung von Tumoren. Da die meisten der derzeitig verwendeten Antitumormittel mit DNA über nicht-kovalente Wechselwirkungen interagieren, wurden die hergestellten Calixarene auf ihren potentiellen antiproliferativen Effekt getestet.

Die Experimente wurden mit fünf menschlichen Zelllinien, abgeleitet von vier Tumortypen, durchgeführt. Die folgenden Zelllinien wurden verwendet: MCF-7 (Brustkarzinom), SW 620 (Dickdarmkarzinom), HCT 116 (Dickdarmkarzinom) und H 460 (Lungenkarzinom). MCF-7, SW 620, HCT 116 und H 460 Zellen wurden als Einzelschichten kultiviert. Als Nährmedium wurde Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) verwendet, ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum (fetal bovine serum, FBS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/mL Penicillin and 100 µg/mL Streptomycin in einer von 5% CO₂ bei 37°C.

Die Zelllinien wurden am Tag 0 auf einer Serie von Standard 96er Mikrotiterplatten bei $1 \cdot 10^4$ bis $3 \cdot 10^4$ Zellen/mL, je nach der Verdopplungszeit der spezifischen Zelllinie, eingepflegt. Die Testsubstanzen wurden in fünf 10-fachen Verdünnungen (10^{-8} bis 10^{-4} M) zugegeben und für weitere 72 Stunden inkubiert. Die Ausgangsverdünnungslösungen wurden vor der jeweiligen Zugabe frisch angesetzt. Das Lösungsmittel wurde ebenfalls auf eventuelle Inhibierungsaktivitäten getestet, dabei wurde dieselbe Konzentration wie in der Substanzlösung eingestellt. Nach 72-stündiger Inkubationszeit wurde die Zellwachstumsrate durch einen MTT-Assay evaluiert, der die Dehydrogenaseaktivität in lebenden Zellen *in vitro* detektiert. Der MTT-Zellproliferations-Assay ist ein colorimetrisches System, welches die Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) in ein unlösliches Formazanprodukt erfasst.^[172] Die mitochondrialen Dehydrogenasen von lebenden Zellen sind in der Lage, das in die Zelle aufgenommene gelbe Tetrazoliumsalz in ein

violettes Formazan umzuwandeln. Dieses kann aus den Zellen herausgelöst und photometrisch bestimmt werden. Dabei korreliert die gemessene Konzentration an Formazan mit dem Proliferationsverhalten der Zellen. Zu diesem Zweck wurde das mit der Substanz behandelte Medium verworfen und MTT zu jedem Well mit einer Konzentration von 20 µg/40 µL pipettiert. Nach vier Stunden Inkubationszeit wurden die Niederschläge in 160 µL DMSO gelöst. Die Absorption (OD, Optische Dichte) wurde mit einem Mikroplattenreader bei 570 nm gemessen. Die Absorption ist direkt proportional zur Zelllebensfähigkeit. Der Prozentsatz an Wachstum (PG) der Zelllinien wurde entsprechend einer der beiden folgenden Gleichungen berechnet^[173]:

$$\text{Wenn } (OD_{\text{test}} - OD_{t0}) \geq 0 \text{ dann: } PG = 100 \times (OD_{\text{test}} - OD_{t0}) / (OD_{\text{ctrl}} - OD_{t0}) \quad \mathbf{10}$$

$$\text{Wenn } (OD_{\text{test}} - OD_{t0}) < 0 \text{ dann: } PG = 100 \times (OD_{\text{test}} - OD_{t0}) / OD_{t0} \quad \mathbf{11}$$

Dabei sind:

OD_{t0} = der Mittelwert der OD-Messungen vor Exposition der Zellen mit den Testsubstanzen.

OD_{test} = der Mittelwert der OD-Messungen nach Zugabe und Inkubation der Testsubstanz.

OD_{ctrl} = der Mittelwert der OD-Messungen nach Inkubation ohne Zugabe der Testsubstanz.

Jeder Testpunkt wurde durch Vierfachbestimmungen in jeweils drei individuellen Experimenten ermittelt. Die Ergebnisse werden als GI_{50} , die für 50% Zellwachstumshemmung benötigte Konzentration, angegeben. Jedes Ergebnis ist ein Mittelwert aus den drei separat durchgeführten Experimenten.

Der GI_{50} misst das Wachstumsinhibierungsvermögen der Testsubstanz und repräsentiert die Konzentration, die eine Wachstumshemmung von 50% verursacht.^[173] Der GI_{50} -Wert wurde für jede Komponente aus den Dosis-Wirkungs-Kurven durch lineare Regression ermittelt. Die Testkonzentrationen wurden so gefittet, dass die PG-Werte über und unter dem jeweiligen Referenzwert liegen (z.B. 50 für GI_{50}). Dafür wurde ein "realer" Wert für jede der Wirkungsparameter erhalten, nur wenn mindestens eine der getesteten Substanzkonzentrationen über, und ebenso eine unter den jeweiligen Referenzwert fällt. Wenn für eine gegebene Zelllinie für alle getesteten Konzentrationen PGs produziert wurden, die den jeweiligen Referenzlevel-Effekt überschreiten, (z.B. PG-Wert von 50), dann wird die höchste getestete Konzentration

als Ausgangswert festgelegt. In den Screeningdaten wird dieser Ausgangswert mit einem vorangehenden ">" Zeichen versehen.

Die entsprechenden Aktivitäten werden durch die dekadischen Logarithmen der molaren Testsubstanzkonzentrationen angegeben, und zwar für die jeweilige Konzentration, die eine 50-prozentige Wachstumshemmung (GI_{50}) bewirken. In Tabelle 24 sind die GI_{50} -Werte für die getesteten Calixarene **1**, **4** und **M1** gezeigt und in Abbildung 77 die jeweiligen Dosis-Wirkungskurven dargestellt. Zusätzlich sind in Tabelle 24 die Ergebnisse für die Benzylammoniumderivate **A** und **MA** von *W. Hu* wiedergegeben.

Tabelle 24: Erhaltene GI_{50} -Werte für die Calixarenderivate **1**, **4** und **M1**, sowie **A** und **MA**.^[171]

Komponente	GI_{50}			
	HCT 116	SW 620	MCF-7	H 460
A	3 ± 0.1	4 ± 4	5 ± 0.4	2 ± 1
MA	2 ± 0.1	2 ± 0.01	2 ± 0.5	1.6 ± 0.04
1	>100	>100	>100 [#]	>100 [#]
4	95 ± 0.2	>100	n.d.*	n.d.*
M1	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1

*Niederschläge beeinträchtigten den MTT-Test; [#]nicht getestet

Die Substanzen mit Benzylammoniumgruppen (**A**) weisen eine ziemlich hohe antiproliferative Aktivität auf. Das Monomer **M1** zeigt gegenüber dem Monomer **MA** eine vergleichbare Aktivität, wohingegen die korrespondierenden Dimere **1** und **4** nicht aktiv sind. Eine mögliche Erklärung für die ermittelten Antiproliferationsaktivitäten könnten die unterschiedlichen positiven Ladungen der Calixarene sein. Während **A** und **MA** unter den experimentellen Bedingungen (pH 7) hoch positiv geladen sind, tragen **1**, **4** und **M1** nur eine positive Ladung pro Calixarenhalbschale.

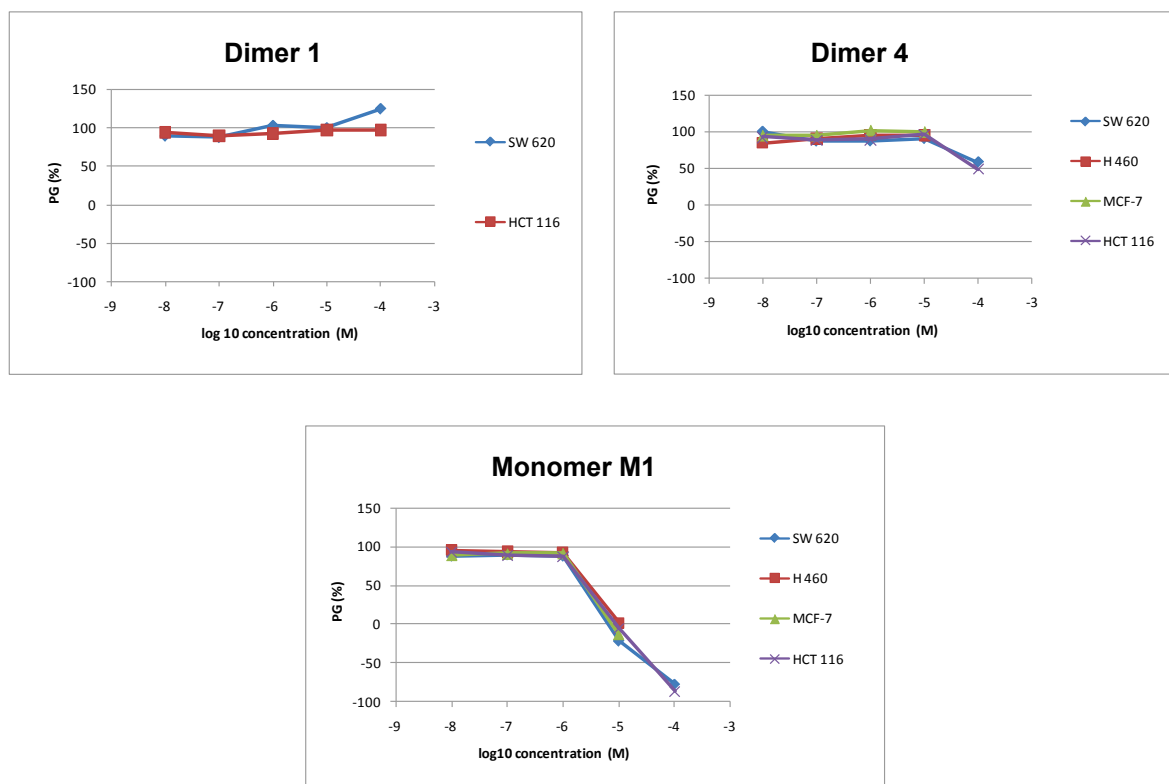


Abbildung 77: Dosis-Wirkungskurven der Calixarene **1**, **4** und **M1**, getestet in vitro.^[171]

Nach den hier präsentierten ersten Screeningtests ist es noch nicht möglich, klare Rückschlüsse über die Wirkungsweise der untersuchten Verbindungen zu ziehen. Einerseits zeigen die Testsubstanzen eine hohe Affinität gegenüber Doppelstrang-DNA in isolierten Systemen, andererseits ist es aufgrund ihres großen Umfangs fraglich, ob sie überhaupt in der Lage sind, die Zellmembran zu passieren. Ein denkbarer Mechanismus könnte die Einlagerung der Testsubstanzen in die Zellmembran sein, wobei der lipophile Teil der Calixarene (Butoxygruppen) in der Membran orientiert und die positiv geladene Seite in die wässrige Lösung zeigen würde (in Richtung Zellinnen- oder Zellaußenraum). In Filmwaagemessungen konnte bereits von *R. Zadnark* gezeigt werden, dass es möglich ist, dass sich Butoxycalixarene mit geladenen Gruppen am oberen Rand in Lipidschichten einlagern.^[174, 175] Da die Calixarene sowohl Kationen als auch Anionen komplexieren, könnte ihre Einlagerung membranabhängige Transportmechanismen beeinträchtigen, und so zu einer Zellapoptose führen.

3.4 Funktionalisierung des Calix[4]arens **9** am unteren Rand mit Polyglycoleinheiten

Da die bisher dargestellten Calix[4]aren-Dimere nicht wasserlöslich sind, und alle bisherigen DNA-Experimente in einer gepufferten Wasser/Methanol 1:1-Mischung durchgeführt werden mussten, die biologische Aktivität der Dimere aber vorzugsweise in wässrigem Medium untersucht werden sollte, ist eine Modifikation unumgänglich um dieses Ziel zu erreichen. Hierbei bietet sich eine Funktionalisierung am unteren Rand des Calixarens in Form von Polyglycoleinheiten an, da diese schon frühzeitig, am Anfang der Synthese, in das Molekül eingeführt werden kann, und bei der weiteren Umsetzung keine Rolle spielt.

Die Calixarenbausteine sollen in der *cone*-Konformation vorliegen, um die Komplexbildung mit DNA zu verstärken. Alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen können so gemeinsam interagieren. Bei einer flexiblen Konformation würde die Komplexbildung erschwert werden, da die Orientierung der Aminogruppen nicht gleichgerichtet ist. Die erhaltene Konformation bei der Modifikation des unteren Randes eines *p-tert.*-Butylcalix[4]arens ist abhängig von den Reaktionsbedingungen (verwendetes Lösungsmittel, Base), den sterischen Anforderungen und der Reaktivität des derivatisierenden Reagenzes.^[85]

Jedoch gibt es gegenwärtig kein allgemeines Konzept für die Synthese bestimmter O-Alkyl- und O-Acyl-Derivate definierter Konformation.^[176]

Das Lösungsmittel soll Einfluss auf die Bildung des Konformers haben. So soll die *cone*-Konformation in polaren Lösungsmitteln, wie DMF oder Acetonitril, gegenüber den anderen möglichen Konformationen stabilisiert werden, da das *cone*-Isomer ein höheres Dipolmoment besitzt. Durch Computersimulationen konnte folgende Reihe mit abnehmenden Dipolmomenten bestätigt werden: *cone* > *partial cone* > *1,2-alternate* > *1,3-alternate*.^[177]

Für die Bildung der *cone* Konformation bei O-Alkylierungs- und O-Acylierungsreaktionen scheint oft ein Templateffekt durch die anwesenden Metall-Ionen aus der Base mitverantwortlich zu sein.^[176] Bei der Reaktion von *p-tert.*-Butylcalix[4]aren **9** mit Bromessigsäureethylester in Aceton mit Na₂CO₃ beispielsweise wird zu 100% das *cone*-Isomer gebildet, während bei der Verwendung von Cs₂CO₃ unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen zu 100% das *partial cone*-Konformer entsteht. Aufgrund seiner Größe kann das Natrium-Ion am unteren Rand mit den Sauerstoffatomen interagieren, während das große Cäsium-Ion am oberen Rand Wechselwirkungen mit den drei Benzolringen und dem

Sauerstoffatom der umgedrehten Einheit in der *partial cone*-Konformation eingeht und so diese zu stabilisieren vermag.

Bei Verwendung der Base Kalium-*tert.*-Butanolat mit Benzol als Lösungsmittel vermögen die Kalium-Ionen das Calixaren in der *partial cone*-Konformation zu fixieren. Bei Verwendung von K_2CO_3 in Acetonitril konnte bei einer Alkylierungsreaktion mit Tosylat jedoch gezeigt werden, dass das Calixaren ausschließlich in der *cone*-Konformation hergestellt wurde.^[85]

Bei Verwendung von NaH als Base wurde stets das *cone*-Konformer erhalten.^[85, 178] Deswegen wurde zunächst versucht, eine Funktionalisierung des unteren Randes mit Polyglycoleinheiten unter Verwendung dieser Base zu erreichen.

Analog der Umsetzung des *p-tert.*-Butylcalixarens **9** mit NaH und Butylbromid als Alkylierungsreagenz, sollten die beiden Reagenzien (2-Bromethyl)-methylether und 1-Brom-2-(2-methoxyethoxy)ethan unter Einhaltung desselben Syntheseprotokolls verwendet werden, um die beiden Calixarene **32** und **33** herzustellen.^[179] Die Umsetzung bereitete mit beiden Reagenzien Schwierigkeiten (Abbildung 78). Während bei der Synthese von **32** selbst nach 11 Tagen Reaktionszeit und bei hohem Überschuss an Base und Bromether (jeweils bis zu 20 eq.) immer noch nur das zweifach und dreifach substituierte Calixaren in der DC und im MS zu detektieren war, konnte mit dem Reagenz 1-Brom-2-(2-methoxyethoxy)ethan neben dem Calixaren-Edukt das zweifach, dreifach und vierfach substituierte Calixaren im MS detektiert werden. Jedoch wurde kein Lösungsmittelgemisch gefunden, in dem das Produkt **33** von den Nebenprodukten getrennt werden konnte.

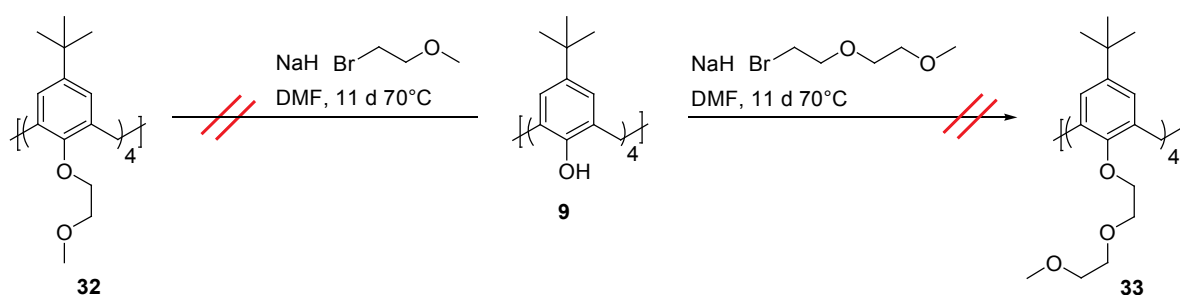


Abbildung 78: Versuchte Synthese der beiden Calixarene **32** und **33**.

In der Literatur wurden Tosylether als Alkylierungsreagenzien vielfach beschrieben.^[85] Um das Calixaren **33** zu synthetisieren, sollte der Tosylether 3,6-Dioxaheptyl-4-toluolsulfonat **34**

aus Diethylenglycolmonomethylether und Toluolsulfonsäurechlorid hergestellt werden. Dazu wurde eine Synthesevorschrift mit NaOH in DCM verwendet^[180] (Abbildung 79).

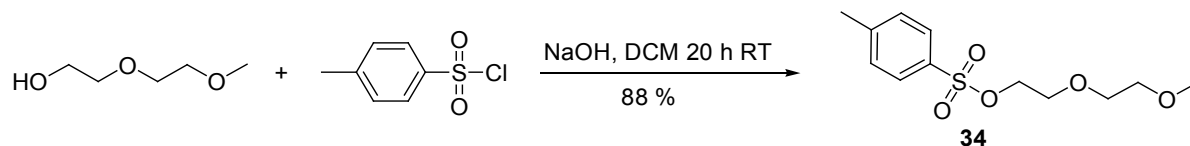


Abbildung 79: Synthese des Tosylethers **34**.

Die Synthese des Calixarens **33** wurde zunächst nach einem Protokoll für die Reaktion von Calix[6]arenen mit dem Tosylether **34** und NaH in DMF durchgeführt.^[181] Unter Verwendung dieses Protokolls erfolgte jedoch für das Calix[4]aren **9** kein Umsatz, in der DC wurden nur die beiden Edukte, Calixaren **9** und Tosylether **34**, detektiert. Auch durch eine Erhöhung der Äquivalente an Base und/oder Tosylether (jeweils bis zu 15 eq.) und längere Reaktionszeiten (7 Tage) erfolgte kein Umsatz.

Als weitere Möglichkeit wurde ein Syntheseprotokoll mit Kaliumcarbonat als Base in Acetonitril verwendet.^[182] Auch hier erfolgte selbst nach 6 Tagen unter Rückfluss keine Reaktion.

Nach Ungaro^[183] wurde das *p*-tert.-Butylcalixaren **9** mit dem Tosylpolyglycolether **34** zu dem gewünschten Polyglycolcalixaren **33** umgesetzt. Allerdings wurde unter den dort beschriebenen Bedingungen das Calixaren in der *partial cone*-Konformation erhalten. Als Base wurde Kalium-*tert*.-Butanolat, als Lösungsmittel Benzol verwendet. Base und Tosylether wurden in mehrere Aliquote aufgeteilt und diese alternierend nach und nach zu dem Calixaren-Edukt zugegeben. Diese Vorgehensweise legt einen Templateffekt durch Kalium-Ionen nahe. Fraglich ist, ob sich die bevorzugte Konformationsbildung durch Veränderung der Reaktionsbedingungen unter Beibehaltung derselben Base ändern lässt. Hierzu sollten Base und Tosylether in einem Schritt zum Calixaren-Edukt gegeben werden, analog der Vorschrift nach dem NaH/DMF-Protokoll, unter gleichzeitiger Änderung des Lösungsmittels. Statt Benzol sollte das polarere THF/DMF 2:1-Gemisch verwendet werden. Durch diese veränderte Prozedur konnte das Polyglycolcalixaren **33** nach säulenchromatographischer Trennung vom Tosyletherüberschuss in 60%iger Ausbeute erhalten werden, aller-

dings nur in der *partial cone*-Konformation. Das Lösungsmittel und die Vorgehensweise in dieser Reaktion haben folglich keinen Einfluss auf die Bildung des bevorzugten Konformers.

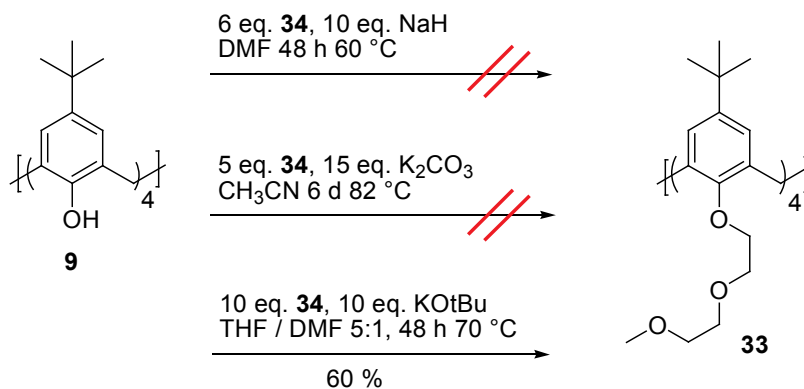


Abbildung 80: Syntheserversuche zum Calixaren **33**.

Die *partial cone* Konformation des Calixarens **33** wurde durch die Aufnahme des ¹H-NMR-Spektrums erkannt. In der *cone*-Konformation wird aufgrund der Symmetrie für die Arylprotonen, sowie für die Protonen der *tert.*-Butylgruppen jeweils nur ein Signal erhalten.

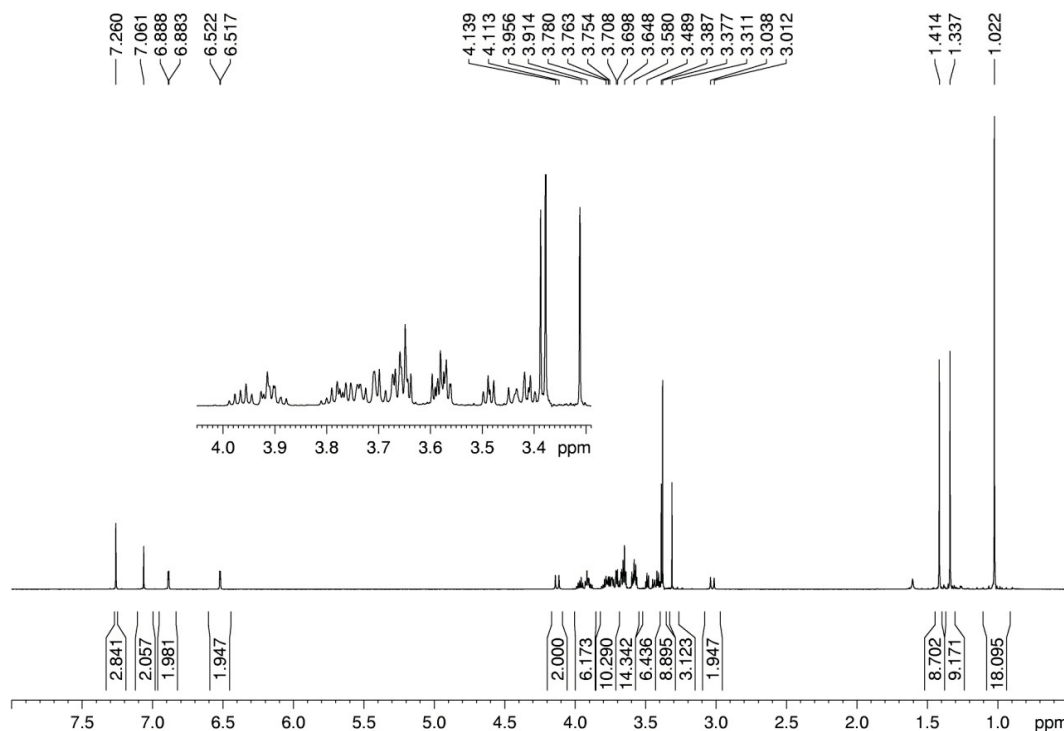


Abbildung 81: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl₃) des Calixarens **33** in der *partial cone* Konformation.

In der *partial cone*-Konformation wird diese Symmetrie durch den umgedrehten Arylring aufgehoben. Das Signal für die *tert.*-Butyl-Protonen ist im Gegensatz zum Edukt **9** in drei Singulets der Intensitäten 2:1:1 aufgespalten: 1.02 (18 H), 1.04 (9 H), 1.41 (9 H) ppm. Eine ähnliche Aufspaltung erfahren die Methylgruppen: 3.31 (3 H), 3.38 (6 H), 3.39 (3 H). Die Arylprotonen werden im Gegensatz zum Edukt gleich in vier unterschiedliche Signale aufgespalten: In zwei Dubletts (6.52, 6.88 ppm), und zwei Singulets (7.06 und 7.26 ppm) mit einer Intensität von jeweils 2 H. In Abbildung 81 ist das aufgenommene ^1H -NMR-Spektrum des Produkts **33** in der *partial cone*-Konformation dargestellt.

Da die *cone*-Konformation für die weitere Synthese und die Rezeptoreigenschaften der Dimere von essentieller Bedeutung ist, und die *partial cone*-Konformation nicht in die *cone*-Konformation überführt werden kann, wurde auf eine Weiterführung der Synthese verzichtet.

Eine weitere Möglichkeit zur Einführung von Polyglycolgruppen in der *cone*-Konformation ist die Umsetzung des Calixarens in ein Kronencalixaren, in dem immer zwei Hydroxygruppen am unteren Rand über einen Glycolspacer miteinander verbrückt werden. Der Name Kronencalixaren leitet sich dabei von dem Begriff des Kronenethers ab. Vorteil dieser Reaktion ist, dass das Calixaren durch die Verknüpfung der Glycolketten in der *cone*-Konformation festgehalten wird. Ein Nachteil bei der Synthese von Kronencalixarenen sind die geringen Ausbeuten.^[85]

Für diese Synthese musste zunächst ein Diethylenglycolditosylat **35** bereitgestellt werden. Dieses Reagenz kann eine doppelte Substitution eingehen. Die Synthese des Ditosylats **35** erfolgte durch die Reaktion von Diethylenglycol und Tosylchlorid mit wässriger NaOH in THF^[184] (Abbildung 82).

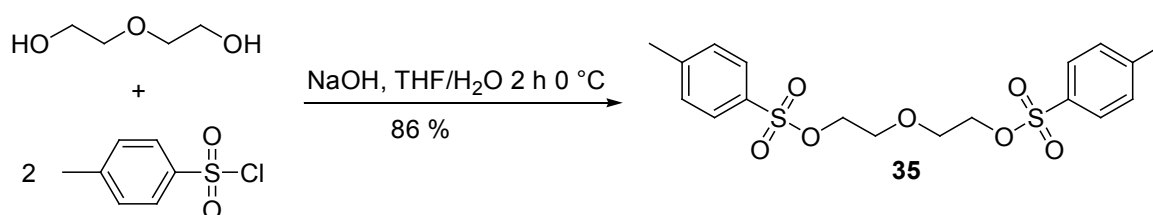


Abbildung 82: Synthese des Ditosylethers **35**.

Das Ditosylat **35** konnte mit dem Calixaren **9** zum Kronenether **36** in *cone*-Konformation umgesetzt werden (Abbildung 83).^[185] Wichtig bei der Darstellung sind die Reaktionsbedingungen. Bei zu hoher Temperatur (70°C) beispielsweise erfolgte kein Umsatz, ebenso wenn das Calixaren vor Zugabe des Ditosylats nicht erhitzt wurde oder das Ditosylat bei RT statt bei 50°C zugetropft wird. Nach einer Reaktionszeit von 48 h bei 50°C und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **36** in 47%iger Ausbeute erhalten werden.

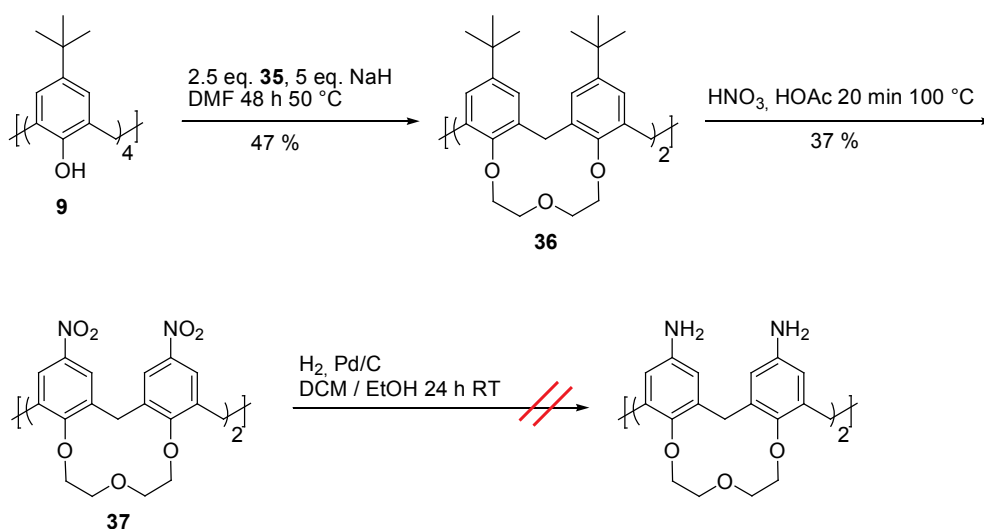


Abbildung 83: Synthese der Calixarenkronenether **36** und **37**.

Das Nitrocalixaren **37** wurde durch eine *ipso*-Nitrierung mit Salpetersäure und Essigsäure nach einem Syntheseprotokoll von Ungaro^[186] in 37%iger Ausbeute erhalten. Die Synthese des Aminokronencalixarens sollte durch Hydrierung mit H₂ und Pd/C erfolgen. Auch nach wiederholtem Ansatz, Austausch des Lösungsmittels (Methanol, Ethylacetat, Ethanol, DCM) und längerer Reaktionsdauer (5 Tage) konnte das Aminokronencalixaren nicht hergestellt werden.

Die Funktionalisierung am unteren Rand des *p*-tert.-Butylcalixarens **9** mit Polyglycoleinheiten in der *cone*-Konformation bleibt eine Herausforderung. Durch diese Modifikation könnten wasserlösliche Calixarene gut zugänglich gemacht werden.

3.5 Synthese eines Dimers mit Tripyrrolspacer

3.5.1 Synthese der *N*-Methylpyrrol-Monomerbausteine

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, ein Calixaren-Dimer mit einem Tripyrrolspacer darzustellen. Die Synthese der Monomerbausteine für den Tripyrrolspacer wird in diesem Kapitel vorgestellt.

Die Synthese der Pyrrolmonomerbausteine erfolgte ausgehend von *N*-Methylpyrrol über **38** und **39** zum Nitropyrrolester **40** über bekannte Synthesevorschriften (Abbildung 84).^[187, 188]

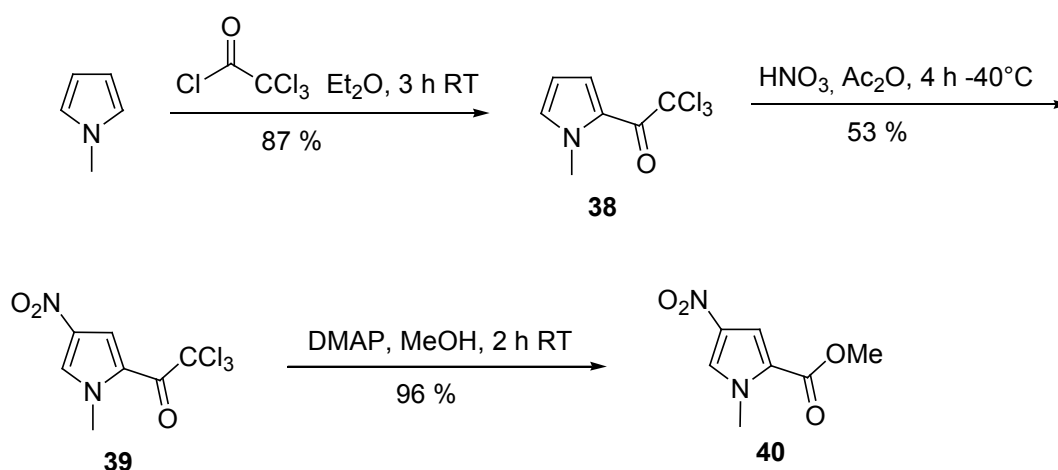


Abbildung 84: Synthese des Nitropyrrols **40** ausgehend von *N*-Methylpyrrol.

Ausgehend vom Nitropyrrol **40** konnten die beiden Bausteine für die folgenden Kupplungen, das Aminopyrrol **41** und die Pyrrolsäure **42** in guten Ausbeuten erhalten werden. Dabei wurden die bekannten Synthesevorschriften leicht modifiziert. Die Einleitung von HCl-Gas nach der Hydrierung von **40**, um das Aminopyrrol **41** in das licht- und luftbeständige Ammoniumsalz zu überführen, konnte durch Zugabe von konzentrierter HCl zur Reaktionsmischung bei vergleichbarer Ausbeute, vermieden werden. Die Boc-Schützung mit nachfolgender Esterspaltung wurde nicht in einem Schritt durchgeführt.^[187] Das Boc-geschützte Monomer **43** konnte leicht aufgereinigt und dann weiter umgesetzt werden. Für die Esterspaltung wurden mehr Äquivalente an NaOH, als in der Literatur angegeben, verwendet.

In Abbildung 85 ist der Syntheseweg zu den beiden Ausgangsmonomeren für die nachfolgenden Kupplungen, **41** und **42**, dargestellt.

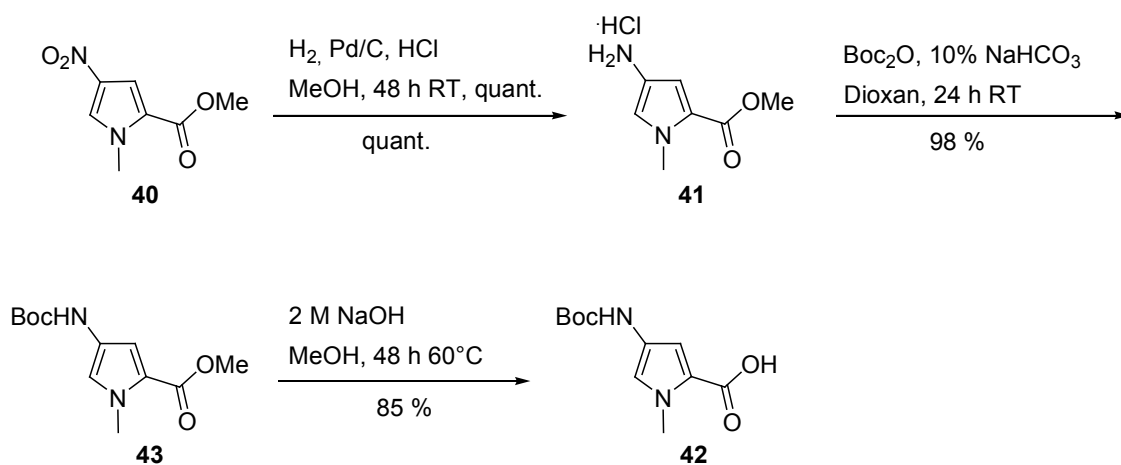


Abbildung 85: Synthese der Pyrrolmonomerbausteine **41** und **42**.

Aus diesen Monomerbausteinen soll ein Tripyrrol erhalten werden. Synthesebedingt wird das Tripyrrol an einer Seite eine Säurefunktion und an der anderen eine Aminogruppe enthalten. Zur Anheftung an die Calixarenhalbschalen **13** müssen jedoch auf beiden Seiten des Tripyrrols Säurefunktionen vorhanden sein, das heißt, es muss eine Disäure vorliegen, die dann mit der Calixarenaminogruppe gekuppelt werden kann. Der Spacer sollte aliphatisch, aber nicht zu lang sein. Aus diesem Grund wurde ein Bernsteinsäurespacer ausgewählt.

Um zu testen, ob der Spacer an die Pyrroleinheit angebracht werden kann, sollte zunächst das Aminopyrrol-Monomer **41** mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt werden. Das Produkt **44** konnte nur in 10%iger Ausbeute erhalten werden, obwohl das Anhydrid im Überschuss zugegeben wurde (Abbildung 86).^[189]

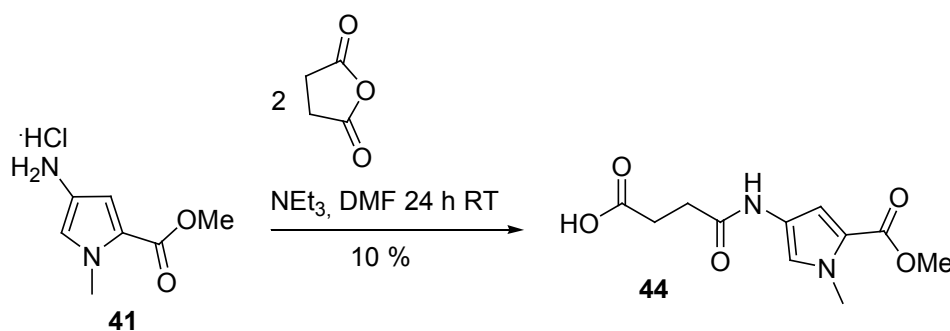


Abbildung 86: Darstellung von **44**.

Aufgrund der schlechten Ausbeute und der nicht erfolgten Kupplung des Calixarens mit dem Bernsteinsäurespacer, wurde Glutarsäuremonomethylesterchlorid **45**, welches eine Methylengruppe mehr enthält, eingesetzt. Die Umsetzung des Aminopyrrols **41** mit dem Säurechlorid **45** zum Diester **46** erfolgte in 78%iger Ausbeute. Durch anschließende Spaltung der beiden Methylesterfunktionen von **46** mit wässriger NaOH in Methanol konnte die Monomer-Disäure **47** in 89%iger Ausbeute erhalten werden (Abbildung 87).

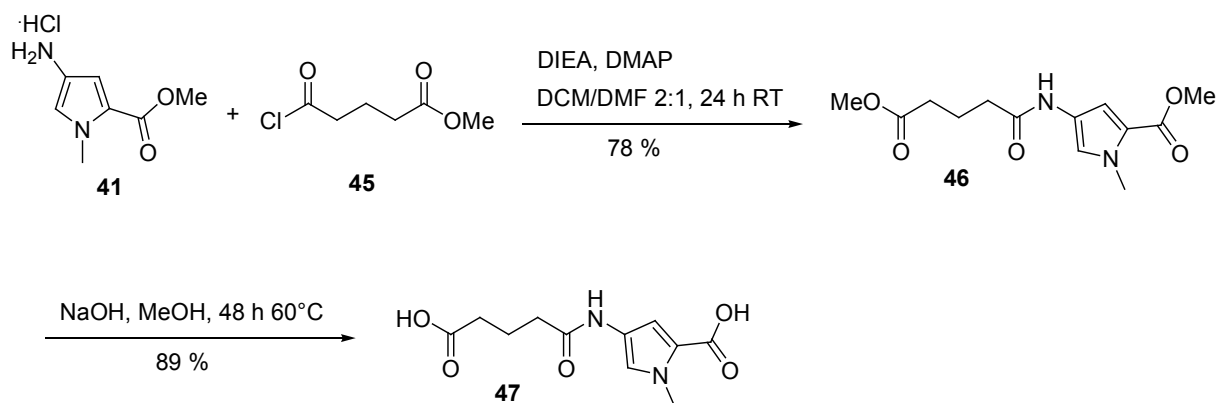


Abbildung 87: Darstellung der Monomer-Disäure **47**.

Dieser Syntheseweg sollte auch auf die Herstellung einer Tripyrrol-Disäure mit Glutarsäurespacer übertragen werden.

Mit der dargestellten Disäure **47** könnte ein Calixaren-Dimer mit einer Pyrroleinheit im Spacer hergestellt werden. Zum Einen könnte dieses Dimer ebenfalls mit DNA getestet werden, und zum Anderen könnte überprüft werden, ob die Kupplung der Disäure an das Calixaren gelingt. Die Synthese wird in Kapitel 3.5.3 besprochen.

3.5.2 Synthese des Tripyrrols 53

Das Tripyrrolamin **51** war ausgehend von den beiden Monomeren **41** und **42** über einen vierstufigen Syntheseweg über bekannte Literaturvorschriften mit leichten Modifikationen zu erreichen.^[119] Dabei wurde für die Kupplungen der beiden Monomere EDCI als Kupplungsreagenz unter Verwendung der Base DMAP in DMF verwendet. Die Abspaltung der jeweiligen Boc-Gruppen erfolgte mit konz. HCl in Ethylacetat (Abbildung 88).

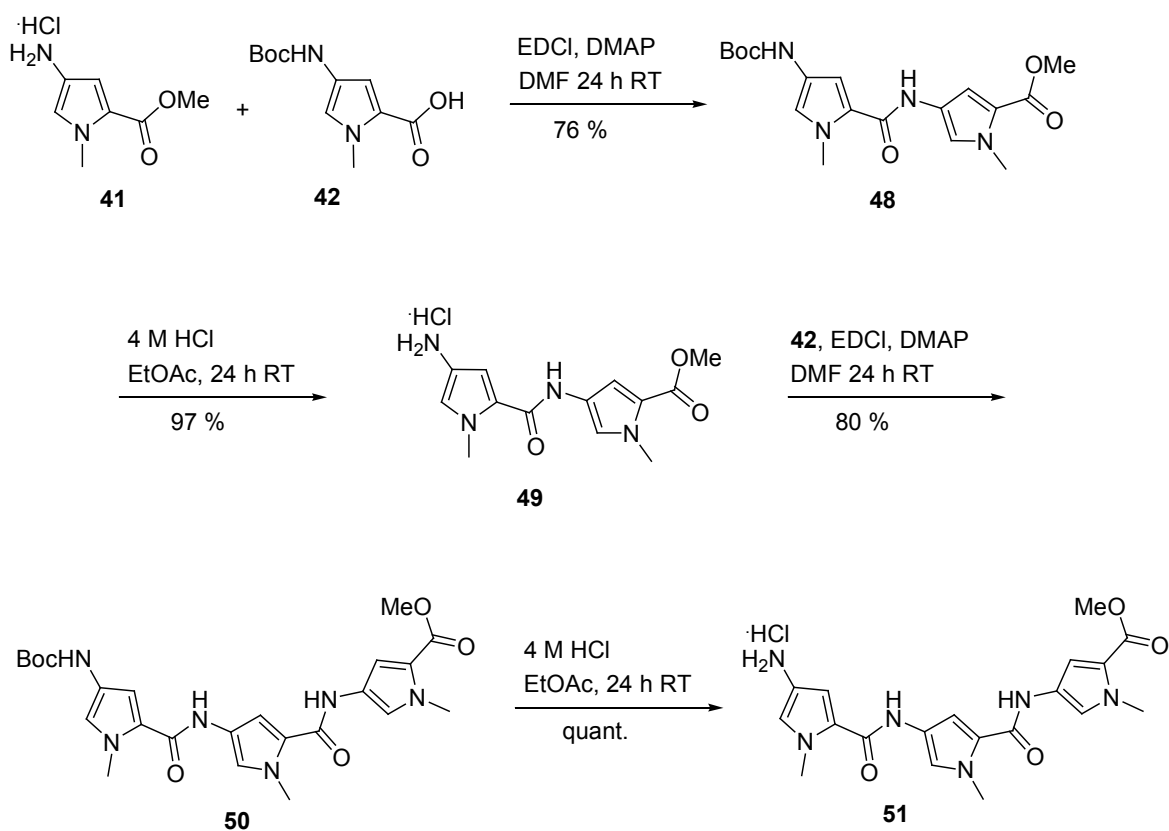


Abbildung 88: Darstellung des Tripyrrols **51**.

Wie schon in Kapitel 3.5.1 beschrieben, sollte das Tripyrrolamin **51** mit Glutarsäuremonomethylesterchlorid **45** umgesetzt werden, um nach Methylesterspaltung die Tripyrrol-disäure **53** zu generieren, die mit zwei Calixarenhalbschalen zu einem Dimer umgesetzt werden sollte.

Die Synthese der Disäure **53** erfolgte analog der Herstellung der Monomerdisäure **47** nach dem in Abbildung 89 dargestellten Syntheseweg.

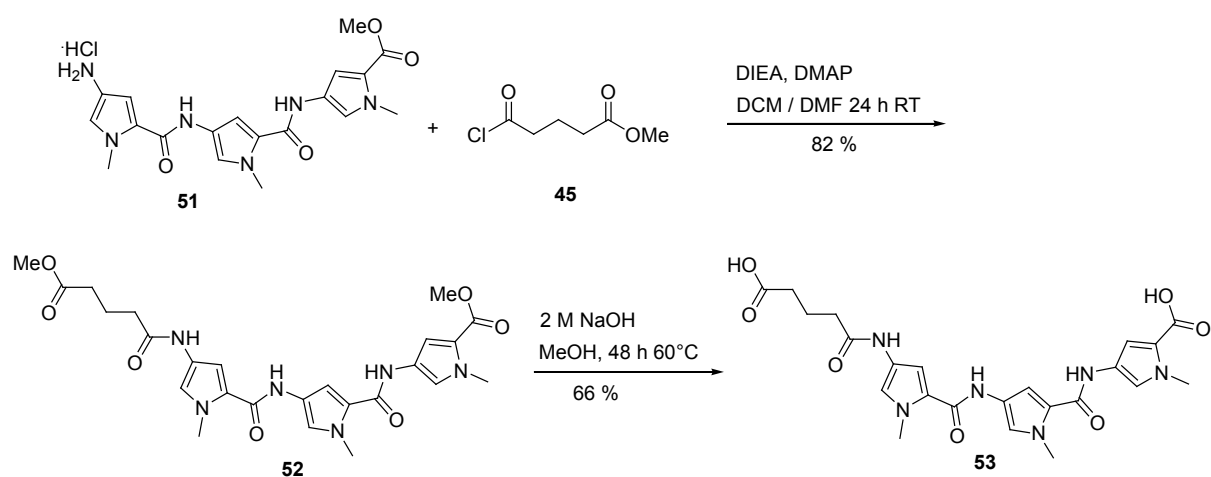


Abbildung 89: Synthese des Tripyrrol-Disäure-Spacers **53**.

Nach Kupplung des Aminotripyrrols **51** mit Glutarsäuremonomethylesterchlorid und folgender basischer Hydrolyse konnte die Tripyrrolidisäure **53** für die weitere Kupplungssynthese mit dem Calixarenmonomer **13** bereitgestellt werden.

3.5.3 Synthese des Calix[4]aren-Dimers **55** mit einem Monopyrrolspacer

Das gut zugängliche Pyrrolisäure-Monomer **47** (siehe Kapitel 3.5.1) kann mit zwei Äquivalenten Calixarenmonomer **13** zu einem Dimer mit einer Pyrroleinheit im Spacer verknüpft zu werden.

Das schon zur Synthese der Calixaren-Dimere **5** und **6** erfolgreich eingesetzte Kupplungsreagenz HCTU mit Cl-HOBt sollte auch zur Herstellung des Boc-geschützten Dimers **54** eingesetzt werden. Durch Verfolgung des Reaktionsverlaufs per DC-Kontrolle konnte erfasst werden, dass das Calixarenmonomer **13** am Ende der Reaktion verbraucht war. Gleichzeitig tauchte ein neuer DC-Spot auf. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte im ^1H -NMR-Spektrum das Fehlen der Boc-Schutzgruppen an den Calixarenhalbschalen nachgewiesen werden.

Die Kupplungsreaktion wurde mit dem Kupplungsreagenz EDCI, das schon für die Dimer- und Trimersynthese der Pyrrole erfolgreich eingesetzt wurde, wiederholt. Dabei wurde nach säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel KG 60 (EtOAc/DCM) das Produkt **54** isoliert. Nach Spaltung der Schutzgruppen mit TFA konnte das Dimer **55** mit einer Pyrroleinheit im Spacer erhalten werden (Abbildung 90).

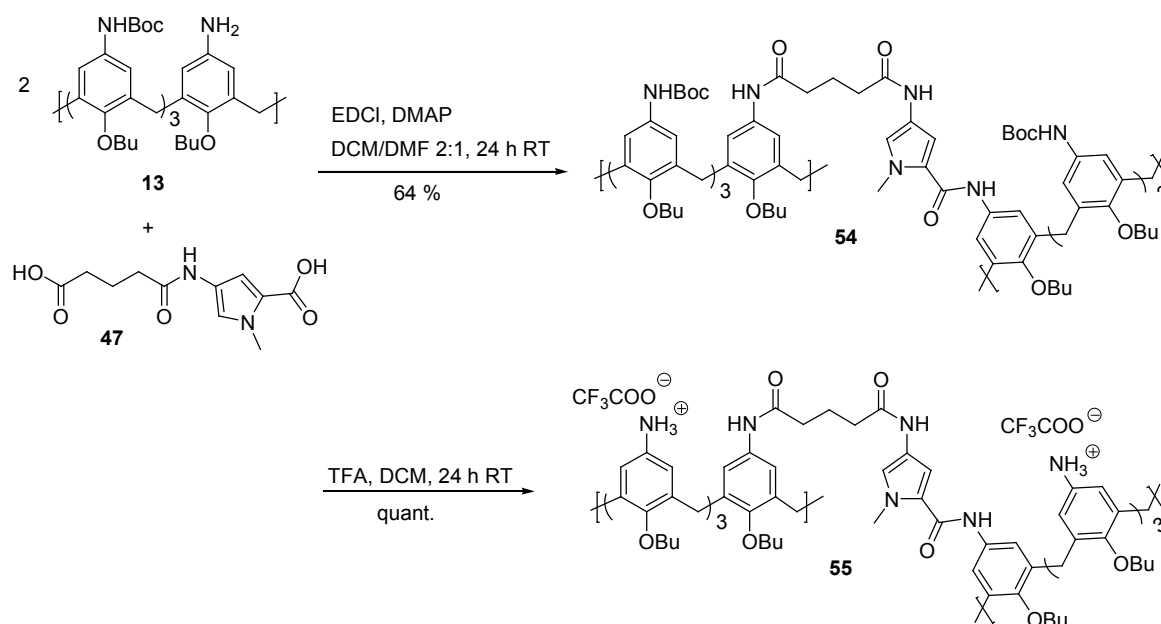


Abbildung 90: Synthese des Calixaren-Dimers **55** mit einer Pyrroleinheit im Spacer.

3.5.4 Kupplungsreaktionen des Calix[4]arens **13** mit dem Tripyrrolspacer **53**

Die Kupplung des Calixarens **13** mit der Tripyrrolidisäure **53** wurde nach dem EDCI-Protokoll durchgeführt, mit dem auch schon das Pyrrolidisäure-Monomer **47** mit guter Ausbeute an das Calixaren gekuppelt wurde. Bei der Reaktion der Tripyrrolidisäure **53** mit zwei Äquivalenten Calixaren **13** zeigte sich, dass auch bei 48 h Reaktionsdauer und unter Verwendung der doppelten Menge an Kupplungsreagenz und Base (5 eq. EDCI, 7.5 eq. DMAP) kein Umsatz erfolgte. Mittels DC- und MS-Analyse wurde jeweils nur das Calixaren-Edukt nachgewiesen.

Daraufhin wurden mehrere Versuche unternommen, mit unterschiedlichen Kupplungsreagenzien eine Peptidbindung des Calixarenmonomers **13** mit dem Spacer **53** zu erhalten. Ein Weg stellte die Kupplung mit dem Reagenz HCTU dar. Hierbei wurden 5 eq. Cl-HOBt und 2 eq. HCTU 10 min lang mit 1 eq. Disäure bei 0°C gerührt, dann 2 eq. des Amins und 6 eq. DIEA hinzugefügt und die Reaktionsmischung 48 h bei RT gerührt. Auch diese Umsetzung blieb erfolglos. Das Calixaren-Edukt **13** konnte mittels DC nachgewiesen werden. Desweiteren wurden noch Kupplungsversuche mit T3P^[190, 191], PyCloP^[192] nach bekannter Synthesevorschrift^[193], Mukaiyama^[144, 194, 195] und DCC durchgeführt, die alle zu keinem Umsatz führten. Immer wurde das Calixaren-Edukt **13** mittels DC und MS detektiert. In Abbildung 91 sind diese Synthesversuche dargestellt.

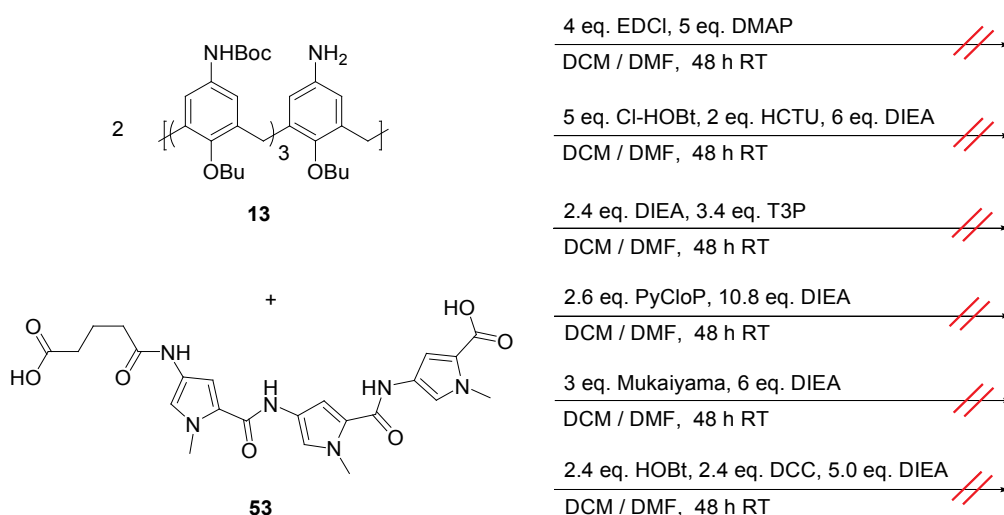


Abbildung 91: Kupplungsversuche des Calixarens **13** mit der Tripyrrolidisäure **53**.

Als letzter Versuch wurde die Disäure **53** mit SOCl_2 *in situ* zum Säurechlorid umgesetzt und dieses mit dem Calixaren **13** versetzt.^[196] Auch bei dieser Synthese zeigte sich keine

Umsetzung, wobei nicht ersichtlich ist, ob das Säurechlorid überhaupt entstanden ist oder sich die Disäure nach Behandlung mit SOCl_2 eventuell zersetzt hat. Zwar wurde direkt nach Umsetzung mit Thionylchlorid ein MS der Lösung in Methanol aufgenommen, in dem man bei erfolgreicher Umsetzung den Dimethylester finden müsste, der jedoch nicht gefunden werden konnte.

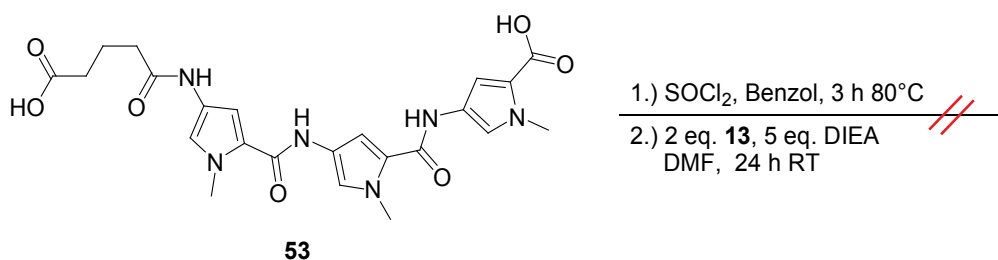


Abbildung 92: Kupplung der Tripyrrolsäure **53** als Säurechlorid.

Nach diesen fehlgeschlagenen Syntheseversuchen sollte der Tripyrrolspacer für eine erfolgreiche Umsetzung modifiziert werden.

3.5.5 Alternative Synthesewege zu einem Calix[4]aren-Dimer mit Tripyrrolspacer

Da die Verknüpfung der aromatischen Säurefunktion des Tripyrrols **53** direkt an die aromatische Aminogruppe des Calixarens erfolgen soll, und dies durch sterische Hinderungen erschwert wird, sollte die aromatische Säurefunktion mit einem γ -Aminobuttersäuremonomethylester **56** (GABA-OMe) versehen werden, um eine aliphatische Spacereinheit einzuführen, die sich bisher gut kuppeln ließ. Um zu überprüfen, ob sich GABA-OMe **56** an die Pyrrolsäurefunktion anknüpfen lässt, sollte zunächst das Pyrrolsäure-Monomer **42** mit dem Aminoester **56** verknüpft werden. Unter Verwendung von EDCI und DMAP konnte das Produkt **57** in guter Ausbeute hergestellt werden (Abbildung 93).

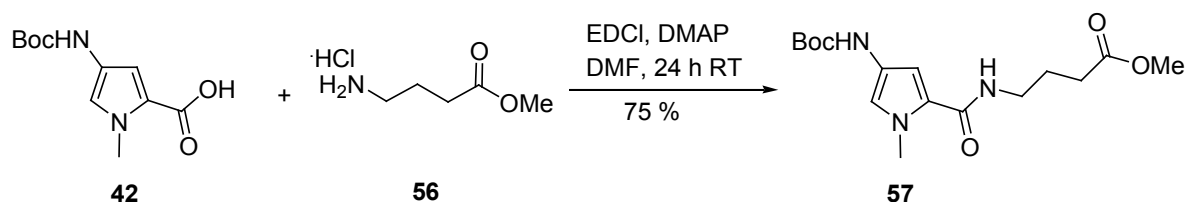


Abbildung 93: Synthese des Monomers **57**.

Nach dieser erfolgreich durchgeführten Synthese mit dem Monomer, sollte auch das entsprechende Tripyrrol hergestellt werden. Hierzu musste zunächst ein Tripyrrolmolekül mit einer freien Säurefunktion bereitgestellt werden. Dazu wurde das Tripyrrol **50** basisch hydrolysiert. Die so erhaltene Tripyrrolsäure **58** wurde mit GABA-OMe **56** nach dem EDCI/DMAP-Protokoll gekuppelt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt, um das Produkt **59** zu erhalten (Abbildung 94).

Der nächste Schritt sollte die Spaltung der Boc-Schutzgruppe mit HCl sein, um die Aminogruppe in einer Folgereaktion mit dem Glutarsäurespacer zu versehen. Jedoch zeigte sich hier, dass der aliphatische Methylester unter den sauren Bedingungen ebenfalls gespalten wurde. Unter diesen Umständen wurde auf eine Weiterverfolgung dieses Synthesewegs verzichtet.

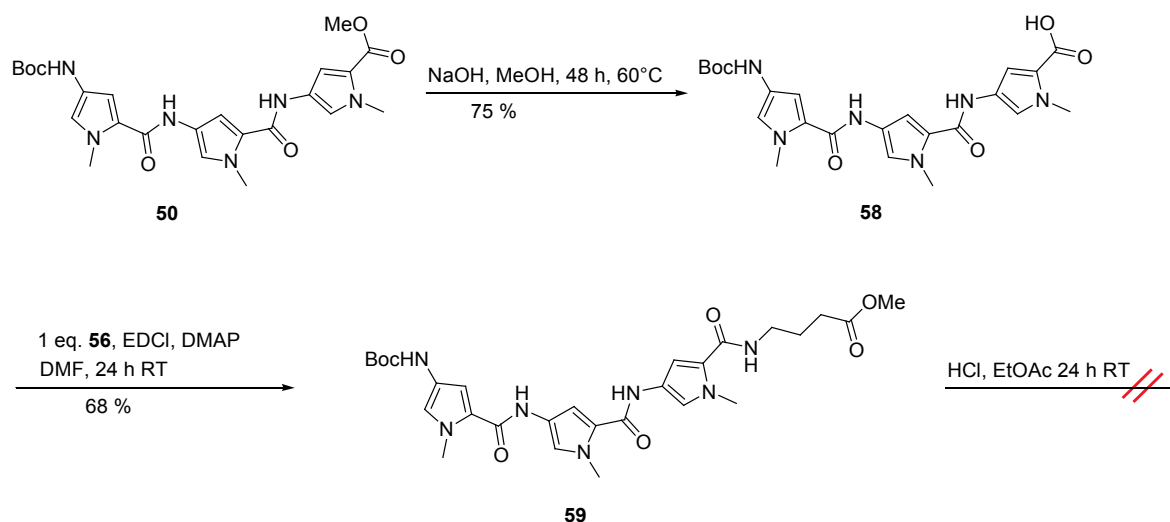


Abbildung 94: Synthese der beiden Produkte **58** und **59**.

Eine weitere Methode zur Herstellung eines Calix[4]aren-Dimers mit einem Glutarsäure-tripyrrolspacer ist der schrittweise Aufbau, indem das Tripyrrol zunächst nur mit einer Calixareneinheit verknüpft wird. Dazu sollte die Calixarenhalbschale **13** mit Glutarsäuremonomethylesterchlorid **45** versehen werden, um das Glutarsäurecalixaren **60** zu erhalten. Nach Abspaltung der Methylesterfunktion von **60** sollte eine Kupplung mit dem Amino-tripyrrol **51** durchgeführt werden. Nach einer weiteren basischen Hydrolyse, Kupplung mit einer weiteren Calixarenhalbschale **13** und anschließender Abspaltung der Schutzgruppen, sollte ein Calixaren-Dimer mit einem Tripyrrolspacer hergestellt werden.

Die Reaktion des Calixarens **13** mit dem Glutarsäurechlorid **45** erfolgte mit *Hünig-Base* und katalytischem Einsatz von DMAP. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das Calixaren **60** in 88%iger Ausbeute erhalten (Abbildung 95).

Im nächsten Syntheseschritt sollte die Esterfunktion von **60** mit NaOH zu **61** verseift werden. Diese Reaktion konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Es wurde nur 10% Rohprodukt erhalten, das nicht weiter aufgereinigt werden konnte. Eine Weiterführung dieses Synthesewegs sollte umgangen werden, indem eine andere Methode zur Dimerdarstellung gewählt wurde.

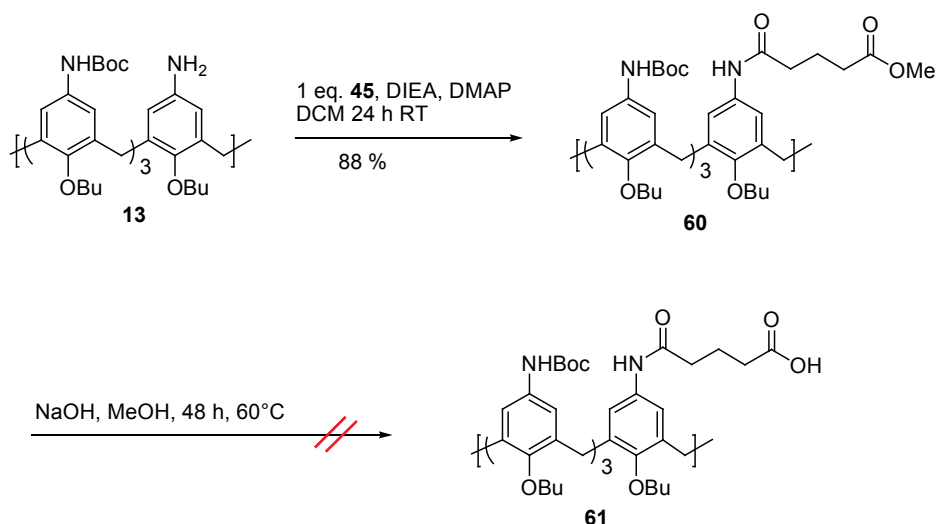


Abbildung 95: Synthese des Glutarsäure-Calixarens **60**.

Durch die Herstellung zweier Calixarenbausteine mit Pyrroleinheiten, die im letzten Schritt über eine Peptidbindung der beiden Pyrroleinheiten miteinander verknüpft werden, sollte das Dimer zugänglich sein. Ein Vorteil dieses neuen Wegs ist die mit EDCI als Kupplungsreagenz immer in sehr guten Ausbeuten durchzuführende Peptidkupplung zwischen der Pyrrolamino-Gruppe und der Pyrrolsäurefunktion. Für diesen Syntheseweg sollte der Baustein **62**, bestehend aus einem Calixaren und einer Nitropyrroleinheit, mit dem Dipyrrol-Calixaren **63**, das eine freie Säuregruppe am Pyrrolende trägt, verbunden werden. Die Nitrogruppe sollte erst *in situ* kurz vor der Kupplung beider Einheiten in eine Aminogruppe durch Hydrierung überführt werden. Eine potentielle Behandlung der licht- und luftlabilen Pyrrol-Aminogruppe mit HCl kann in diesem System nicht durchgeführt werden, sollten nicht auch die Boc-Schutzgruppen der Calixareneinheit entfernt werden.

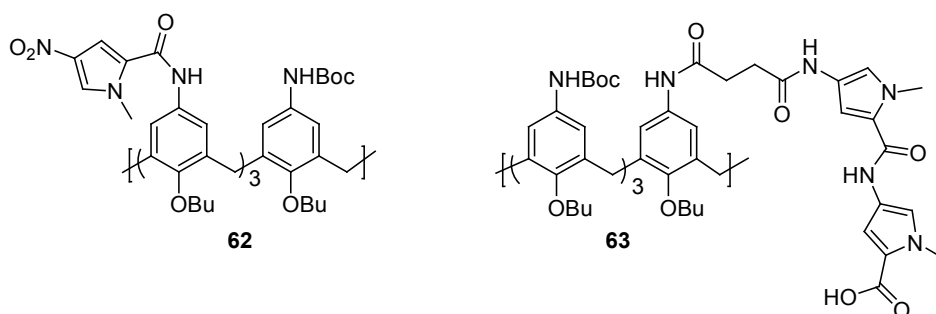


Abbildung 96: Strukturformeln der beiden Calixaren-Pyrrol-Einheiten **62** und **63**.

Die Synthese der Calixareneinheit **62** konnte ohne weitere Probleme bewältigt werden. Zunächst wurde das Nitropyrrol **40** mit wässriger NaOH in Methanol verseift und anschließend mit dem Calixarenmonomer **13** mit EDCI gekuppelt. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte so das Calixaren **62** erhalten werden (Abbildung 97).

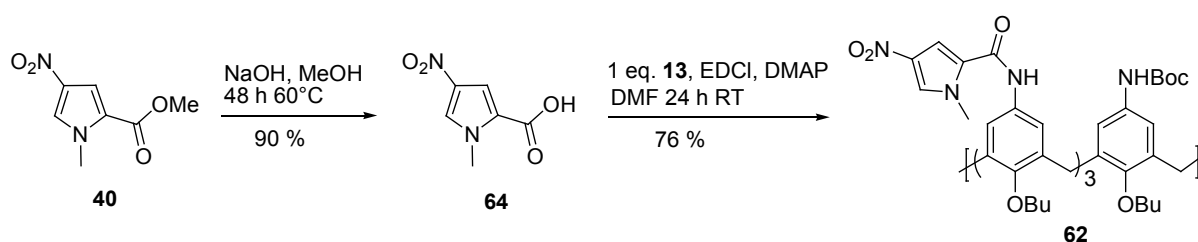


Abbildung 97: Synthese der Calixareneinheit **62**.

Ausgehend von dem Dipyrrol **49** wurde das Calixaren **63** in drei Stufen erzielt. Zunächst wurde das Aminodipyrrol **49** mit Bernsteinsäuremonobenzylester **65** gekuppelt und so das Molekül **66** in sehr guter Ausbeute erhalten. Die Z-Schutzgruppe musste eingeführt werden, da im nachfolgenden Schritt nur eine der beiden geschützten Carbonsäurefunktionen, die aliphatische, entschützt werden sollte, um mit dem Aminocalixaren **13** eine Kupplungsreaktion einzugehen. Die Z-Schutzgruppe wurde gewählt, da sie durch Hydrierung entfernt werden kann, ohne den Methylester zu spalten. Um die Schutzgruppe vollständig abzuspalten, war es nötig, den Hydrierkolben auf 45°C zu erhitzen. Nach Aufarbeitung konnte die Dipyrrolmonosäure **67** erhalten werden. Die freie Säure wurde im nächsten Reaktionsschritt mit dem Calixaren **13** und EDCI/DMAP umgesetzt, um so nach säulenchromatographischer Trennung das Produkt **68** zu erhalten (Abbildung 98).

Der letzte Syntheseschritt zur Herstellung der Calixareneinheit **63** sollte die Methylester-spaltung mit wässriger NaOH in Methanol sein. Um die Boc-Schutzgruppen der Calixaren-einheit nicht vorzeitig abzuspalten, wurde bei der sauren Aufarbeitung statt mit sonst verwendeter wässrigen Schwefelsäure, mit Kaliumhydrogensulfat auf pH = 3 angesäuert und sofort mit Ethylacetat extrahiert.

Es zeigte sich jedoch, dass das Molekül schon während der basischen Esterhydrolyse zersetzt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde nach beendeter Reaktion mit Wasser versetzt und mit Ether gewaschen, um dann im nächsten Schritt angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert zu

werden. Schon in der Etherphase wurde das dreifach Boc-geschützte Calixaren-Edukt **13** nahezu quantitativ in nicht umgesetzter Form zurückgewonnen.

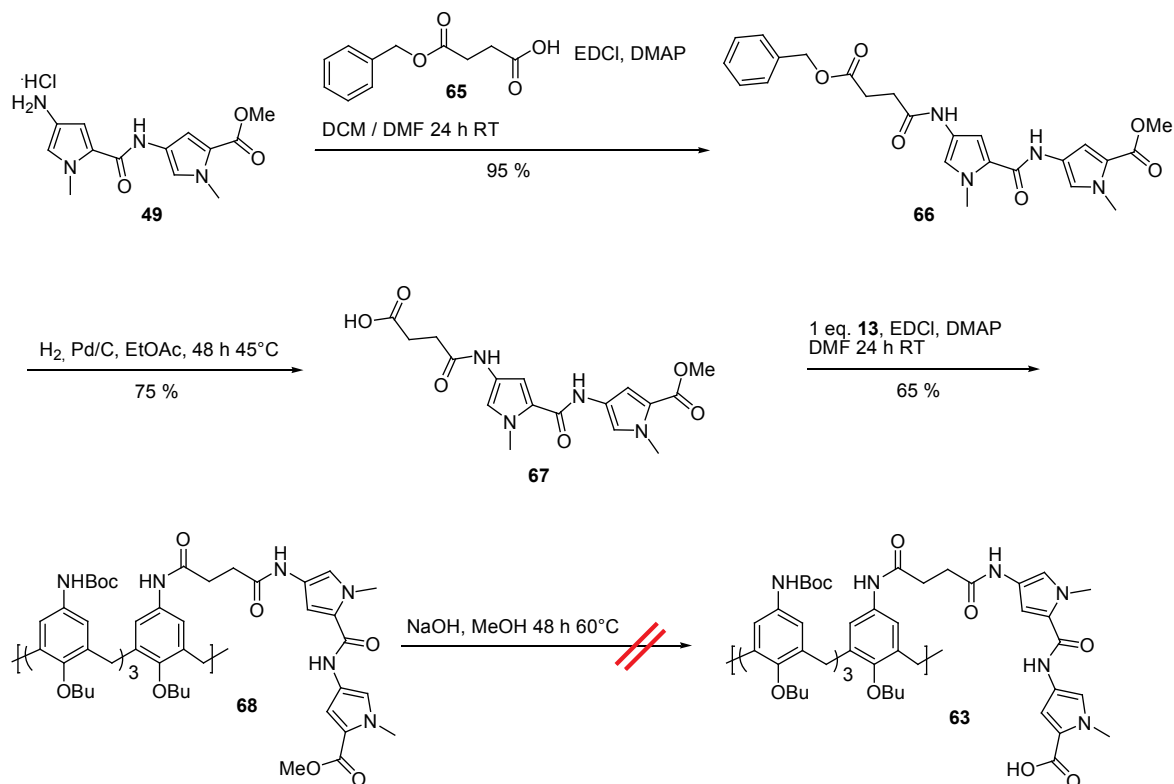


Abbildung 98: Syntheschema zum Baustein **63**.

Im ^1H -NMR-Spektrum des vermeintlichen Produktes aus der Ethylacetatphase waren nur Signale des Dipyrrols zu finden. Allerdings fehlten im Spektrum die beiden Signale der Spacerprotonen, was eine Abspaltung des Bernsteinsäurepacers aus dem Molekül **68** nahelegt, wobei das Calixaren-Edukt **13** als Amin, sowie das Dipyrrrol als Säure freigesetzt wurden.

Diese hier beobachtete Abspaltung des Spacers bietet eventuell eine Erklärung, warum auch während der versuchten Kupplungsreaktionen zwischen dem Tripyrrolglutarsäurespacer **53** und dem Calixaren **13** kein Umsatz erfolgte, sondern immer nur das Calixaren-Edukt **13** detektiert werden konnte. Vielleicht hat sich das Dimer gebildet, wurde aber noch während der erfolgten Reaktion durch einen noch nicht verstandenen Mechanismus zerstört, indem der Glutarsäurespacer abgespalten wurde. Fraglich dabei bleibt nur, warum die aromatische Säurefunktion mit dem Calixarenmonomer nicht reagiert hat. Unerklärbar bleibt auch das unterschiedliche Verhalten der beiden ähnlichen Pyrroldisäuren **47** und **53**. Während das

Pyrrolsäure-Monomer **47** ohne Probleme mit zwei Calixarenhalbschalen verknüpft werden konnte, blieb die Synthese der Tripyrrolsäure **53** unter den gleichen Bedingungen erfolglos.

Eine in der Festphasenpeptidchemie mit der Fmoc-Strategie häufig beobachtete Nebenreaktion, besonders bei der Aminosäure Prolin, ist die Bildung eines Diketopiperazins durch den intramolekularen, nucleophilen Angriff einer freien α -Aminogruppe an der C-terminalen Carbonylgruppe, wodurch das Peptid vom Harz abgespalten wird.^[197] Durch die Verwendung der Base Piperidin zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird diese Reaktion stark katalysiert.^[198]

Die Abspaltung des Glutarsäurespacers ließe sich durch einen mehrstufigen, intramolekularen Mechanismus erklären, in dem zunächst durch einen nucleophilen Angriff des Amidstickstoffatoms an die Carbonylgruppe der anderen Amidfunktion, unter Abspaltung des Amino-pyrrols, ein cyclisches Produkt gebildet wird. In dem vorhandenen basischen Milieu könnte eine Ringöffnung mit anschließender Abspaltung des aliphatischen Spacers als cyclisches Anhydrid erfolgen, wobei das Calixarenamin-Edukt freigesetzt würde.

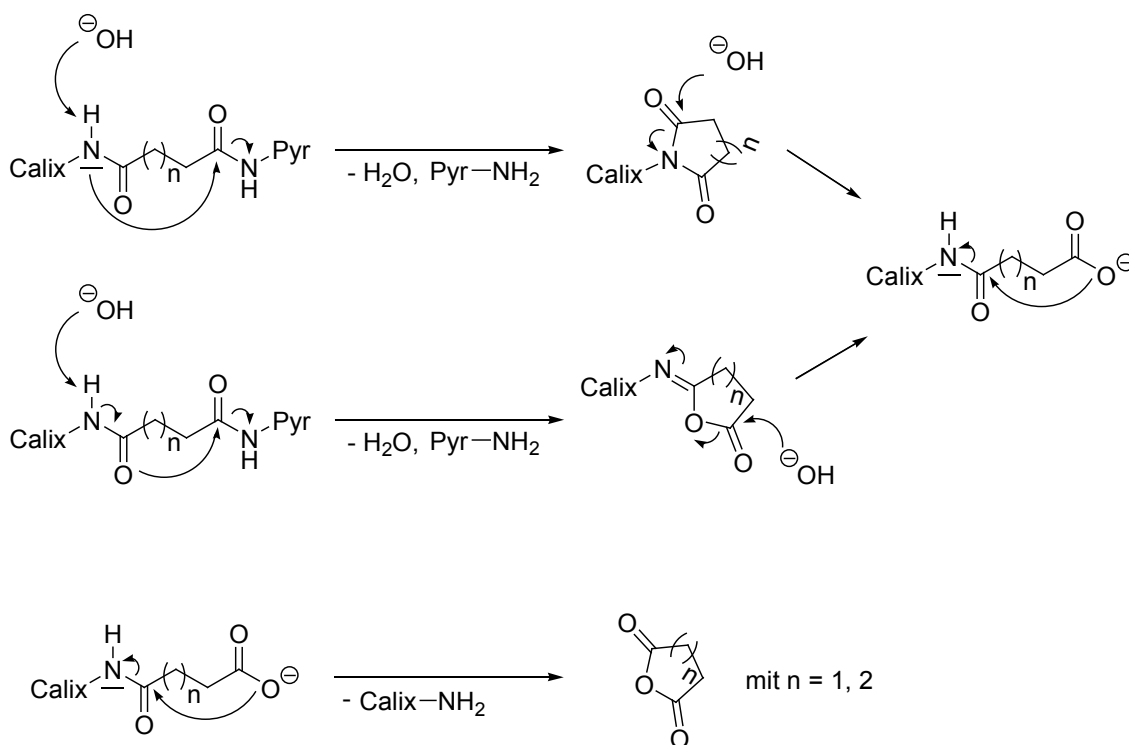


Abbildung 99: Mögliche Mechanismen zur Spacer-Abspaltung, mit Calix = Calixarenbaustein und Pyr = Pyrroleinheit.

Ein weiterer denkbarer Mechanismus der Spacer-Abspaltung ist der nucleophile Angriff des Sauerstoffatoms der einen Amidfunktion an das Carbonyl-Kohlenstoffatom der anderen

Amidgruppe unter Bildung eines cyclischen Zwischenprodukts und Ringöffnung desselben durch Base mit folgender Abspaltung des Spacers als cyclisches Anhydrid. Diese beiden möglichen Mechanismen sind in Abbildung 99 dargestellt.

Nach diesen besprochenen Spacer-Abspaltungs-Mechanismen war es interessant zu erfahren, ob ein Bernsteinsäurespacer, der mit einem Aminotripyrrol verknüpft ist, unter basischen Bedingungen ebenfalls abgespalten wird. Hierzu wurde das Reagenz Bernsteinsäuremonomethylesterchlorid **69** mit dem Aminotripyrrol **51** zunächst zum Diester **70** umgesetzt. Im nächsten Syntheseschritt sollte die Abspaltung der beiden Methylesterfunktionen zum Tripyrrol **71** erfolgen. Wie bei der Reaktion des Calixarens **68** wurde der Bernsteinsäure-Spacer abgespalten. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnten nur das Calixaren-Edukt **13** und das Tripyrrolamin **51** detektiert werden.

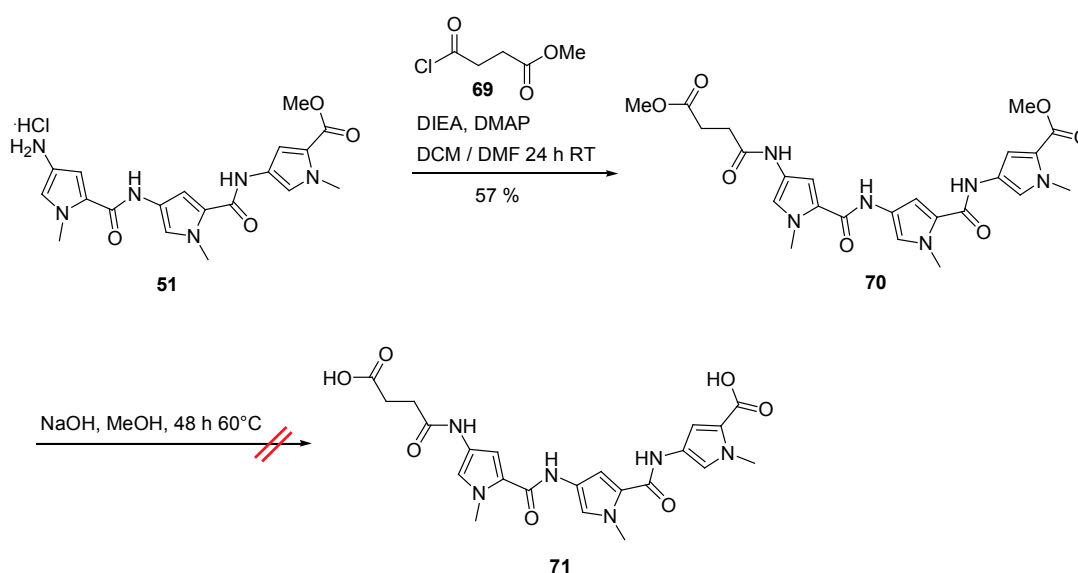


Abbildung 100: Synthese eines Bernsteinsäure-Tripyrrolspacers.

Es lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob das wässrige Medium oder die Base der Grund für die Abspaltung der Spacereinheit ist.

3.5.6 Synthese der Calix[4]aren-Dimere 79 und 80 mit Tripyrrolspacern

Um der möglichen Abspaltung des Spacermoleküls vorzubeugen, sollte die Tripyrroleinheit mit einem aromatischen Spacer, in Form von Isophthalsäuremonomethylester **72**, sowie einem Malonsäuremonomethylester **73**, der nur eine Methylengruppe enthält, versehen werden. Der aromatische Spacer ist zwar nicht sehr flexibel, aber im Hinblick auf eine erfolgreiche Kupplung sehr vielversprechend, da er keine Cyclisierungsreaktionen eingehen kann. Ebenso sollte der Malonsäurespacer keine Abspaltungsreaktionen eingehen, da bei einer Cyclisierung ein thermodynamisch ungünstiger Vierring gebildet werden würde. Auf diesem Wege sollten die beiden Tripyrrolspacer **74** und **75** hergestellt werden, die im weiteren Verlauf zu den entsprechenden Calixaren-Dimeren umgesetzt werden sollten (siehe Abbildung 101).

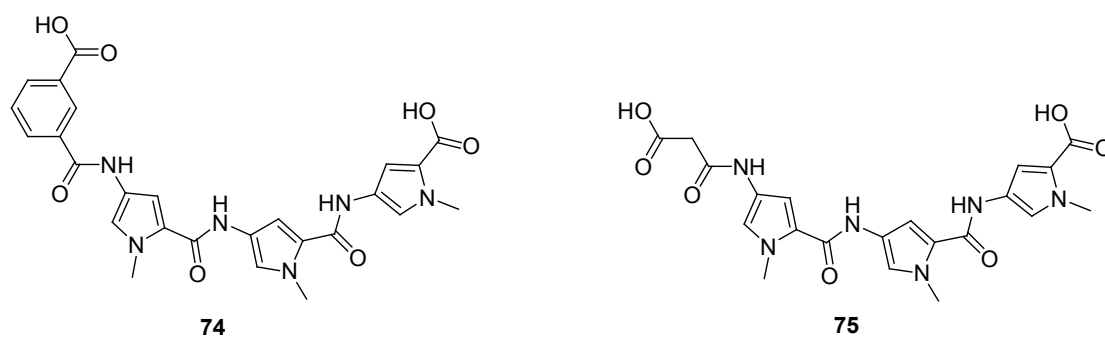


Abbildung 101: Tripyrrolspacer **74** und **75**.

Für die Synthese des Isophthalsäure-Tripyrrolspacers **74** wurde das Aminotripyrrol **51** als Edukt verwendet und mit Isophthalsäuremonomethylester **72** nach dem EDCI/DMAP-Protokoll zu dem Diester **76** umgesetzt. Durch Behandlung des Diesters mit wässriger NaOH in Methanol und saurer Aufarbeitung konnte die gewünschte Tripyrrol-Disäure **74** in sehr guter Ausbeute erhalten werden (siehe Abbildung 102).

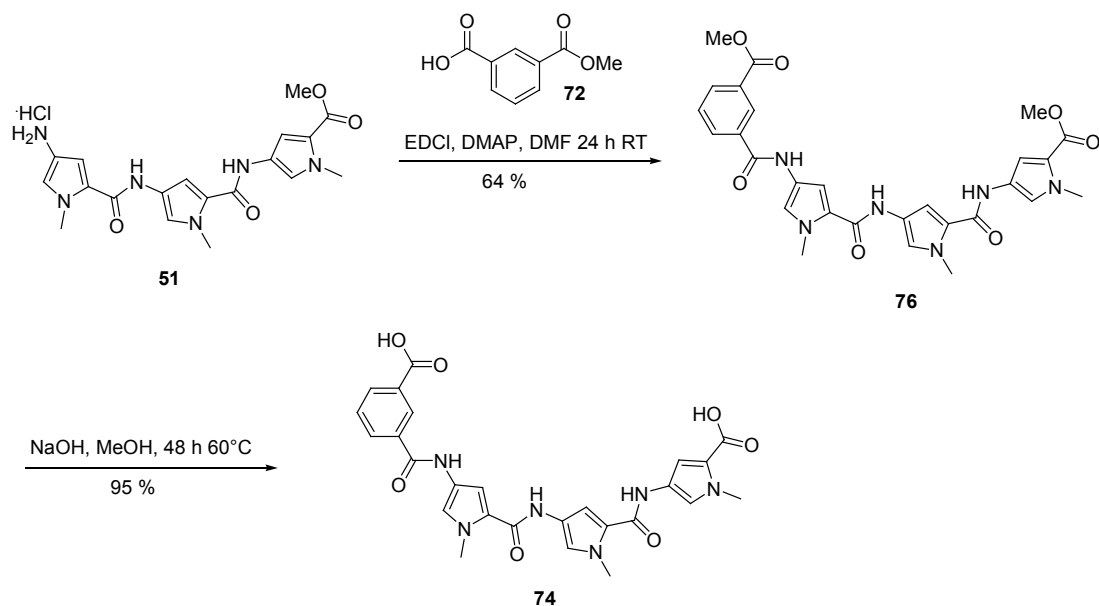


Abbildung 102: Synthese der Disäure 74.

Für die Synthese des Malonsäure-Tripyrrolspacers **75** wurde das Aminotripyrrol **51** mit Malonsäuremonomethylesterchlorid **73**, *Hünig-Base* und DMAP versetzt und nach 24 h Reaktionszeit zum Diester **77** umgesetzt. Nach basischer Hydrolyse mit NaOH konnte die Disäure **75** erhalten werden (Abbildung 103).

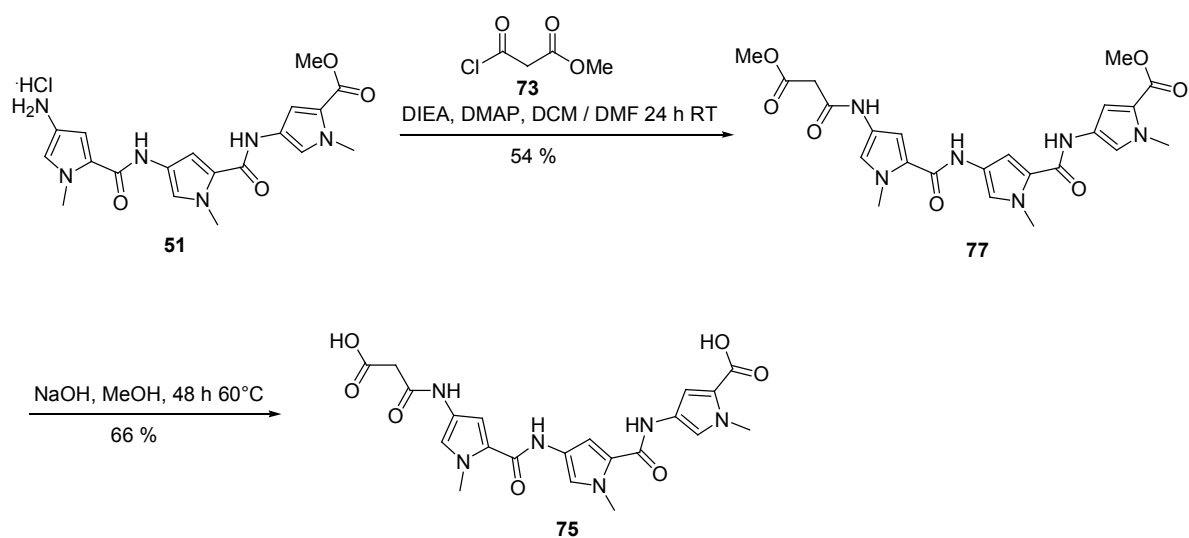


Abbildung 103: Synthese des Malonsäure-Tripyrrolspacers 75.

Die erfolgreich hergestellte Tripyrroldisäure **74** wurde in einer Peptidkuppelungsreaktion nach dem EDCI/DMAP-Protokoll mit zwei Äquivalenten des Calixarenmonomers **13** umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das Boc-geschützte Calixaren-Dimer **78** in 20%iger Ausbeute erhalten. Die Boc-Schutzgruppen wurden mit TFA abgespalten, und so das Calixaren-Dimer **79** mit einem Isophthalsäure-Tripyrrolspacer hergestellt (Abbildung 104).

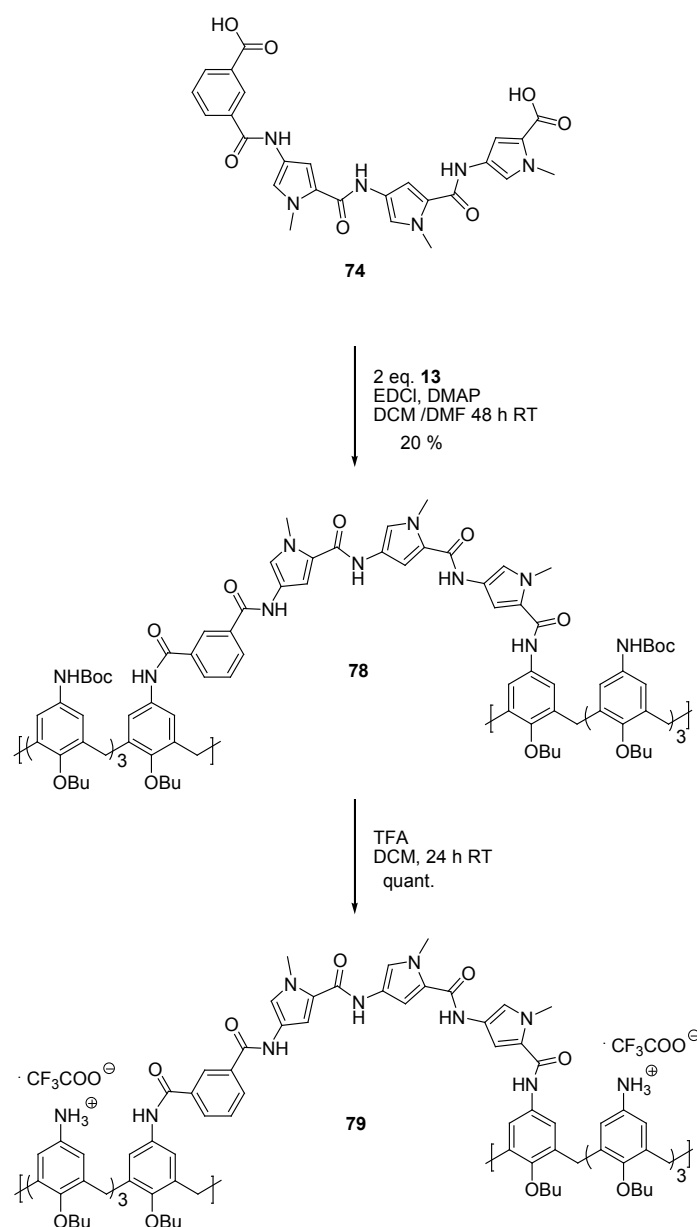


Abbildung 104: Synthese des Calix[4]aren-Dimers **79** mit Isophthalsäure-Tripyrrolspacer.

Die Disäure **75** konnte ebenfalls erfolgreich zu einem Calixaren-Dimer mit Tripyrrolspacer **80** umgesetzt werden. Dazu wurde die Tripyrrolidisäure **75** mit zwei Äquivalenten Calixaren **13** unter Verwendung von EDCI/DMAP versetzt und nach säulenchromatographischer Reinigung das Boc-geschützte Dimer **81** erhalten, welches durch Behandlung mit TFA quantitativ zum Calix[4]aren-Dimer **80** umgesetzt wurde (Abbildung 105).

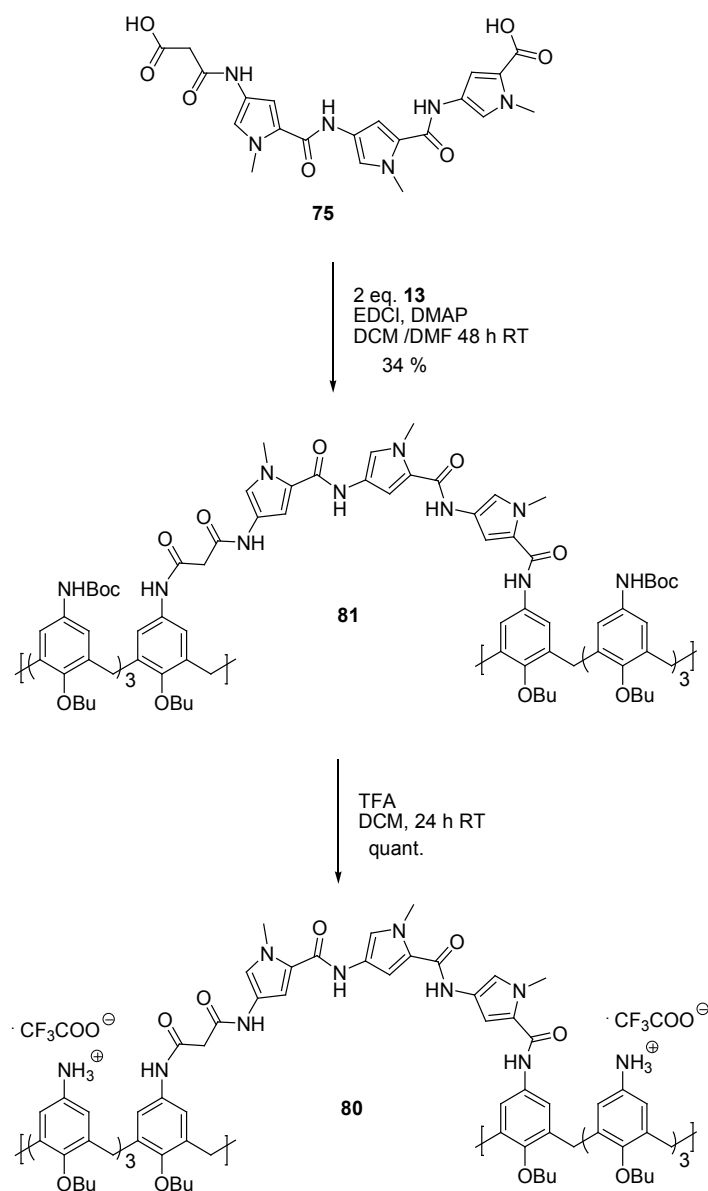


Abbildung 105: Darstellung des Calixaren-Dimers **80**.

3.6 Bindungsstudien mit den Dimeren **55**, **79** und **80**

3.6.1 Fluoreszenztitrationen

3.6.1.1 Fluoreszenztitrationen der Dimere **55**, **79** und **80** mit 12 BP [Fl]-DNA-Strängen

Die hergestellten Anilincalix[4]aren-Dimere **55**, **79** und **80** (Abbildung 106) sollten auf ihre Bindungseigenschaften mit DNA untersucht werden. Das Bindungsverhalten sollte dann mit dem des Anilincalix[4]aren-Dimers **1** verglichen werden, um eine mögliche Veränderung der DNA-Affinität durch den Austausch des aliphatischen Spacers von Dimer **1** durch einen Pyrrolspacer direkt aufzuzeigen.

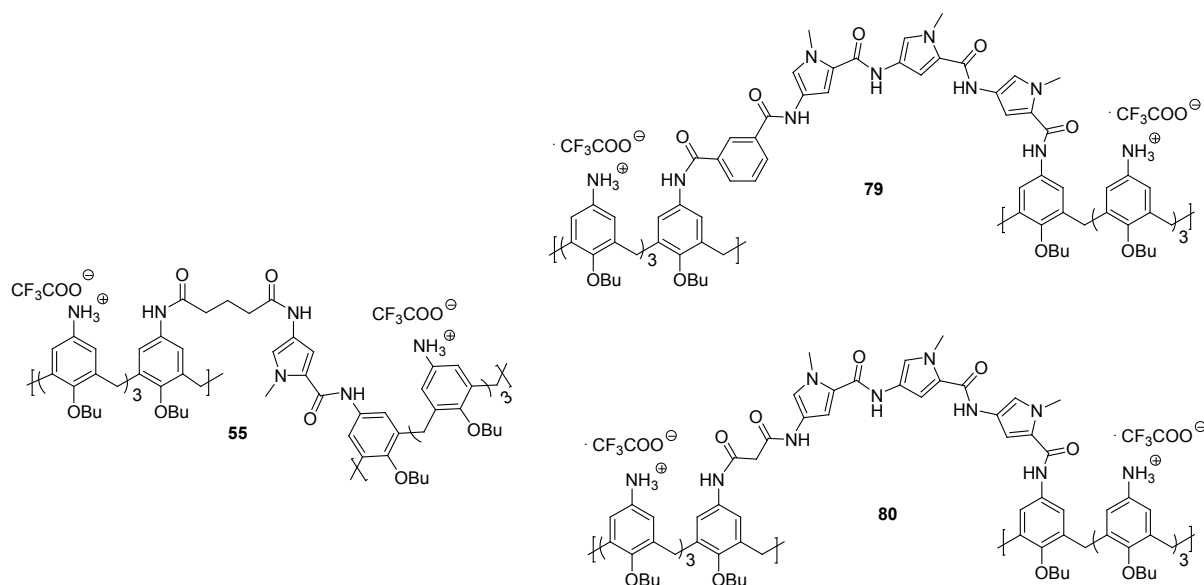


Abbildung 106: Molekülstrukturen der Dimere **55**, **79** und **80**.

Die Fluoreszenztitrationen mit den Dimeren **55**, **79** und **80** wurden analog der in den Kapiteln 3.1.1 und 5.4.1 beschriebenen Prozedur durchgeführt. Auch hier wurde die Fluoreszenzintensität der [Fl]-DNA durch Zugabe der Dimere während des Titrationsprozesses gequencht, siehe Kapitel 5.4.1 (Exp. Teil).

Die für die 12 BP [Fl]-DNA erhaltenen Assoziationskonstanten K_a liegen in der gleichen Größenordnung wie diejenigen der schon untersuchten Anilincalixaren-Dimere mit

aliphatischen Spacereinheiten, Dimer **80** besitzt mit einer $K_a = 1.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ die höchste DNA-Affinität. Lediglich die ermittelten Komplexstöchiometrien sind für die drei neuen Dimere etwas geringer und vergleichbar mit der Stöchiometrie des Guanidinium-Dimers **7**. Tabelle 25 zeigt die aus den Fluoreszenztitration erhaltenen Daten.

Tabelle 25: Assoziationskonstanten $K_a [\text{M}^{-1}]$, Komplexstöchiometrien, $\log K_a$ und freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpien $\Delta G [\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}]$ für die Komplexe der Dimere **55**, **79** und **80** mit 12 BP [Fl]-DNA.

12 BP [Fl]-DNA				
	$K_a [\text{M}^{-1}]$	Stöch.	$\log K_a$	$\Delta G [\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}]$
55	$6.3 \cdot 10^5 (\pm 7\%)$	14:1	5.8	-7.9
79	$8.9 \cdot 10^5 (\pm 6\%)$	11:1	5.9	-8.1
80	$1.5 \cdot 10^6 (\pm 16\%)$	12:1	6.2	-8.4

Stöchiometrie angegeben als [Rezeptor] : [DNA]

Da Tripyrroleinheiten mit höherer Affinität die kleine Furche der DNA von AT-reichen Sequenzen erkennen können, kann die Möglichkeit einer Bindung der Dimere mit Tripyrrol-spacern in der kleinen Furche nicht ohne weiteres ausgeschlossen werden. Gegen eine solche Einlagerung spricht natürlich die Größe des Calixaren-Dimers, jedoch konnte schon mehrfach gezeigt werden, dass die kleine Furche durch geeignete Liganden um die doppelte Breite aufgeweitet werden kann.^[17]

Fluoreszenztitrationen mit den fluoreszenzmarkierten AT- und GC-DNA-Doppelsträngen sollen aufklären, ob die Bindung an AT- oder GC-Basenpaaren bevorzugt erfolgt. Gleichzeitig kann ein Hinweis erhalten werden, ob die Dimere bevorzugt in der kleinen Furche binden könnten. Das Tripyrrolmotiv bindet bevorzugt in der kleinen Furche von AT-reichen DNA-Abschnitten, da die exocyclische Aminogruppe der DNA-Base Guanin eine Bindung in der kleinen Furche von DNA mit GC-reicher Sequenz verhindert.

Es zeigte sich, dass die Dimere **55**, **79** und **80** keine Spezifität gegenüber AT- und GC-reichen 12 BP DNA-Strängen haben. Für beide Polynucleotide wurden jeweils ähnliche Assoziationskonstanten um die Größenordnung $1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ erhalten. Für das Dimer **55** war die ermittelte K_a für die GC-reiche DNA um eine halbe Größenordnung kleiner als für die AT-DNA.

Tabelle 26: Assoziationskonstanten K_a [M^{-1}], Komplexstöchiometrien, $\log K_a$ und freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpien ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$] für die Komplexe der Dimere **55**, **79** und **80** mit 12 BP (AT) [FI]-DNA und 12 BP (GC) [FI]-DNA.

12 BP (AT) [FI]-DNA					12 BP (GC) [FI]-DNA			
	K_a [M^{-1}]	Stöch.	$\log K_a$	ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$]	K_a [M^{-1}]	Stöch.	$\log K_a$	ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$]
55	$1.1 \cdot 10^6$ ($\pm 18\%$)	18:1	6.0	-8.2	$4.7 \cdot 10^5$ ($\pm 20\%$)	15:1	5.7	-7.7
79	$1.3 \cdot 10^6$ ($\pm 16\%$)	16:1	6.1	-8.3	$1.1 \cdot 10^6$ ($\pm 26\%$)	13:1	6.0	-8.2
80	$1.8 \cdot 10^6$ ($\pm 27\%$)	16:1	6.3	-8.5	$1.4 \cdot 10^6$ ($\pm 15\%$)	15:1	6.1	-8.3

Stöchiometrie angegeben als [Rezeptor] : [DNA]

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Dimere **55**, **79** und **80** an AT- und GC-reichen Sequenzen gleich stark binden und sprechen gleichzeitig gegen eine bevorzugte Bindung in der kleinen Furche. Die Komplexstöchiometrien sind auch hier für die Pyrrol-Dimere insgesamt etwas niedriger als für das Dimer **1** bei gleichzeitig erhöhten Werten für die Assoziationskonstanten.

Festgehalten werden kann, dass durch den Einsatz von Tripyrrolpeptiden in der Calixaren-Spacereinheit der Dimere keine Unterscheidung der Affinität zwischen AT- und GC-reicher Doppelstrang-DNA festgestellt werden konnte.

3.6.1.2 Fluoreszenztitrationen der Dimere **55**, **79** und **80** mit 20 BP DNA-Strängen

Auch die Fluoreszenztitrationen mit den schon aus Kapitel 3.3.1.4 bekannten 20 BP [FI]-DNA-Doppelsträngen zeigten eindeutig, dass noch keine Sequenzspezifität vorhanden ist. Die erhaltenen Werte für die Assoziationskonstanten sind für die jeweiligen Dimere mit den drei getesteten Polynucleotiden von gleicher Größenordnung. Dabei wurden wieder für das Dimer **80** die höchsten K_a -Werte erhalten ($1 \cdot 10^6 M^{-1}$). Hier unterscheiden sich die Werte für die DNA-Doppelstränge geringfügig, der K_a -Wert für die 20 BP (AT) [FI]-DNA ist um eine halbe

Größenordnung kleiner als die Werte für die 20 BP (GC) [FI]-DNA und 20 BP [6-FAM]-RNA. In den nachfolgenden Tabellen sind die Ergebnisse der Titrationsen zusammengefasst.

Tabelle 27: Assoziationskonstanten K_a [M^{-1}], Komplexstöchiometrien, $\log K_a$ und freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpien ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$] für die Komplexe der Dimere **55**, **79** und **80** mit 20 BP (AT) [FI]-DNA und 20 BP [6-FAM]-RNA.

20 BP (AT) [FI]-DNA					20 BP [6-FAM]-RNA			
	K_a [M^{-1}]	Stöch.	$\log K_a$	ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$]	K_a [M^{-1}]	Stöch.	$\log K_a$	ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$]
55	$5.4 \cdot 10^5$ ($\pm 27\%$)	23:1	5.7	-7.8	$1.1 \cdot 10^5$ ($\pm 20\%$)	19:1	5.0	-6.8
79	$6.3 \cdot 10^5$ ($\pm 21\%$)	21:1	5.8	-7.9	$8.9 \cdot 10^5$ ($\pm 29\%$)	18:1	5.9	-8.1
80	$5.3 \cdot 10^5$ ($\pm 21\%$)	25:1	5.7	-7.8	$1.3 \cdot 10^6$ ($\pm 27\%$)	22:1	6.1	-8.3

Stöchiometrie angegeben als [Rezeptor] : [DNA]

Tabelle 28: Assoziationskonstanten K_a [M^{-1}], Komplexstöchiometrien, $\log K_a$ und freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpien ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$] für die Komplexe der Dimere **55**, **79** und **80** mit 20 BP (GC) [FI]-DNA.

20 BP (GC) [FI]-DNA				
	K_a [M^{-1}]	Stöch.	$\log K_a$	ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$]
55	$1.5 \cdot 10^5$ ($\pm 19\%$)	20:1	5.2	-7.0
79	$7.9 \cdot 10^5$ ($\pm 28\%$)	16:1	5.9	-8.0
80	$1.0 \cdot 10^6$ ($\pm 21\%$)	19:1	6.0	-8.1

Stöchiometrie angegeben als [Rezeptor] : [DNA]

Auch die hier ermittelten Daten aus den Titrationsen sind wieder ein Hinweis auf eine Bindung in der großen Furche, da in der kleinen Furche von GC-reichen Regionen die exocyclische Aminogruppe von Guanin eine Anlagerung der Tripyrrolspacereinheiten stören würde.^[153] Ungeklärt bleibt noch, warum die erhaltenen Assoziationskonstanten für die RNA vergleichbar hoch sind wie für die DNA. Da die RNA in der A-Form vorliegt, in der die kleine Furche breit und die große Furche sehr schmal ist, ist hier eine Einlagerung in der kleinen Furche nicht auszuschließen.

3.6.1.3 Fluoreszenztitrationsen der Dimere 55, 79 und 80 mit ausgewählten 12 BP DNA Strängen

Durch den Einsatz dreier verschiedener 12 BP [Fl]-DNA-Sequenzen, AAT, ATGC, sowie AAC sollte nochmals geprüft werden, ob sich für eine der drei unterschiedlichen Motive eine bevorzugte Bindung ergibt.

Wie in Tabelle 29 zu sehen, stellte sich jedoch keinerlei Selektivität gegenüber einer bestimmten Sequenz heraus. Vielmehr war es so, dass die Dimere **79** und besonders **80** mit hoher Affinität alle drei DNA-Doppelhelices zu binden vermögen.

Tabelle 29: Assoziationskonstanten K_a [M^{-1}], Komplexstöchiometrien, $\log K_a$ und freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpien ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$] für die Komplexe der Dimere **1**, **79** und **80** mit 12 BP (AAT) [Fl]-DNA und 12 BP (ATGC) [Fl]-DNA.

12 BP (AAT) [Fl]-DNA					12 BP (ATGC) [Fl]-DNA			
	K_a [M^{-1}]	Stöch.	$\log K_a$	ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$]	K_a [M^{-1}]	Stöch.	$\log K_a$	ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$]
1	$5.0 \cdot 10^5$ ($\pm 12\%$)	14:1	5.7	-7.7	$1.4 \cdot 10^6$ ($\pm 31\%$)	11:1	6.1	-8.3
79	$2.3 \cdot 10^6$ ($\pm 21\%$)	13:1	6.4	-8.6	$1.2 \cdot 10^6$ ($\pm 19\%$)	10:1	6.1	-8.3
80	$7.7 \cdot 10^6$ ($\pm 29\%$)	15:1	6.9	-9.3	$5.5 \cdot 10^6$ ($\pm 17\%$)	13:1	6.7	-9.2

Stöchiometrie angegeben als [Rezeptor] : [DNA]

Tabelle 30: Assoziationskonstanten K_a [M^{-1}], Komplexstöchiometrien, $\log K_a$ und freie Gibbs'sche Assoziationsenthalpien ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$] für die Komplexe der Dimere **1**, **79** und **80** mit 12 BP (AAC) [Fl]-DNA.

12 BP (AAC) [Fl]-DNA				
	K_a [M^{-1}]	Stöch.	$\log K_a$	ΔG [$kcal \cdot mol^{-1}$]
1	$8.6 \cdot 10^5$ ($\pm 32\%$)	14:1	5.9	-8.1
79	$8.7 \cdot 10^6$ ($\pm 15\%$)	14:1	6.9	-9.4
80	$1.3 \cdot 10^7$ ($\pm 22\%$)	13:1	7.1	-9.7

Stöchiometrie angegeben als [Rezeptor] : [DNA]

Für die Sequenz AAT bindet das Dimer **80** um eine Größenordnung stärker, als Dimer **1**, für die Sequenz AAC sogar um 1.5 Größenordnungen, mit einer $K_a = 1.3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Dieser erhaltene Wert ist unter den Anilincalixaren-Dimeren die bislang größte ermittelte Assoziationskonstante und ist vergleichbar mit der ermittelten K_a für das Guanidinium-Dimer **7** (mit 12 BP [FI]-DNA).

Durch den Einbau von Tripyrroleinheiten in den Spacer konnte zwar keine sequenzselektive Basenerkennung erreicht werden, aber die Affinität zu DNA wieder weiter gesteigert werden. Das Ziel, eine Sequenzselektivität zu erreichen, war mit den hier hergestellten Tripyrrol-spacern auch noch nicht zu erwarten, da hierzu ein längerer Spacer mit unterschiedlichen Heterozykleneinheiten und einer Hairpin-ähnlichen Struktur eingesetzt werden dürfte. Es konnte aber gezeigt werden, dass die beiden Dimere **79** und **80** durch ihre Tripyrrol-Spacereinheiten einen zusätzlichen Bindungsbeitrag liefern. Dimer **55** dagegen mit einer Pyrroleinheit im Spacer hat keinen höheren Einfluss auf die DNA-Bindung als die Anilincalixaren-Dimere.

3.6.2 Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay

Zur weiteren Überprüfung der DNA-Affinität und Vergleich mit dem Dimer **1** wurden Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assays der Dimere **55**, **79** und **80** mit 12 und 20 BP DNA-Doppelsträngen durchgeführt. Die Proben wurden dabei analog der in Kapitel 5.4.2 beschriebenen Prozedur vorbereitet und gemessen. In Abbildung 107 sind die erhaltenen Messdaten durch lineare Auftragung der relativen Fluoreszenzintensität I_{rel} gegen den CE dargestellt. Zum Vergleich ist der Graph für das Dimer **1** mit eingefügt.

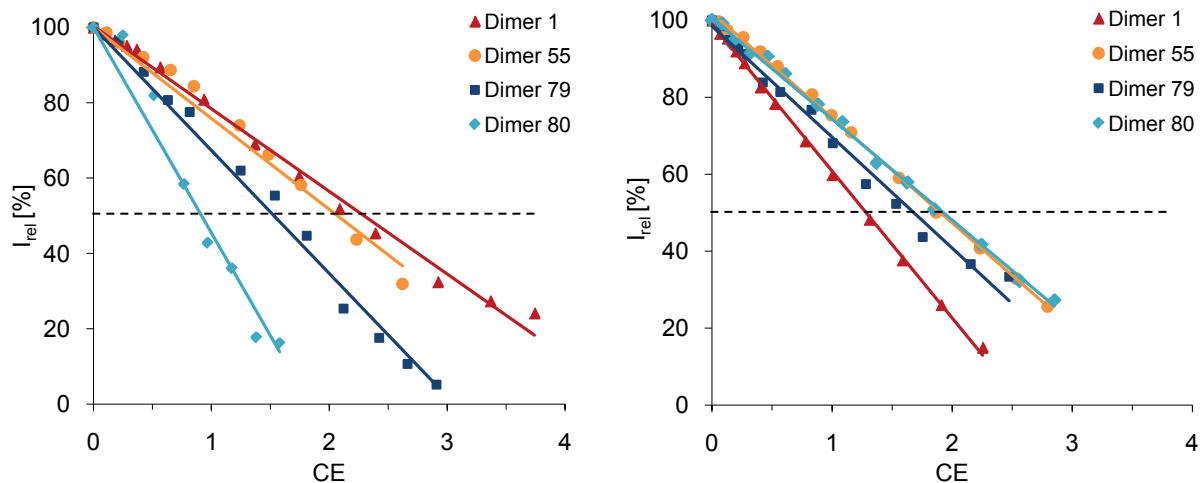


Abbildung 107: Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay der Dimere **1**, **55**, **79** und **80** mit 12 BP DNA (links) und 20 BP DNA (rechts).

Die Kurven mit der 20 BP DNA und den Dimeren **55**, **79** und **80** sind sehr ähnlich, hier wurden auch sehr ähnliche C_{50} - und CE_{50} -Werte erhalten. Im Vergleich zu Dimer **1** sind die erhaltenen Werte etwas größer, die Affinität also scheinbar kleiner. Für den Ethidiumbromid-Assay mit der 12 BP DNA sind die erhaltenen Graphen für die Dimere **79** und besonders **80** von steilerem Verlauf, als für Dimer **1**. Das spiegelt sich auch in den niedrigeren Werten für die korrespondierenden CE_{50} -Werten wieder.

Tabelle 31: C_{50} - und CE_{50} -Werte der Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assays der Dimere **1**, **55**, **79** und **80** mit 12 BP DNA und 20 BP DNA.

Rezeptor	Ladung	12 BP DNA		20 BP DNA	
		C_{50} [μ M]	CE_{50}	C_{50} [μ M]	CE_{50}
1	+2	28	2.3	28	1.4
55	+2	25	2.0	38	1.9
79	+2	19	1.6	34	1.7
80	+2	12	1.0	38	1.9

Während Dimer **55** mit 12 BP DNA ähnliche Werte wie das Dimer **1** aufweist, zeigt Dimer **80** mit 12 BP DNA einen ähnlich niedrigen CE_{50} -Wert wie das Dimer **7**.

Alle drei untersuchten Dimere können Ethidiumbromid vollständig aus den jeweiligen DNA-Doppelsträngen verdrängen. Dabei ist die Affinität für die kürzere 12 BP DNA höher als für die 20 BP DNA.

3.6.3 DAPI-Verdrängungs-Assay

Zusätzlich zu dem Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay wurde auch für die Dimere **55**, **79** und **80** der DAPI-Verdrängungs-Assay durchgeführt. Für die Dimere **1** und **7** konnte schon gezeigt werden, dass DAPI erfolgreich aus der kleinen Furche von 20 BP (AT) DNA entfernt werden kann, was mit einer Interaktion der Dimere in der großen Furche erklärt werden kann.

Auch mit den Dimeren **55**, **79** und **80** konnte der Farbstoff DAPI komplett aus der kleinen Furche von AT-reicher DNA verdrängt werden. Während die Affinität für Dimer **55** vergleichbar mit der des Dimers **1** ist, sind die Kurven von **79** und **80** steiler und ergeben eine etwas höhere Affinität. Dabei zeigt diesmal das Dimer **79** den jeweils kleinsten Wert für die C_{50} - und CE_{50} -Werte.

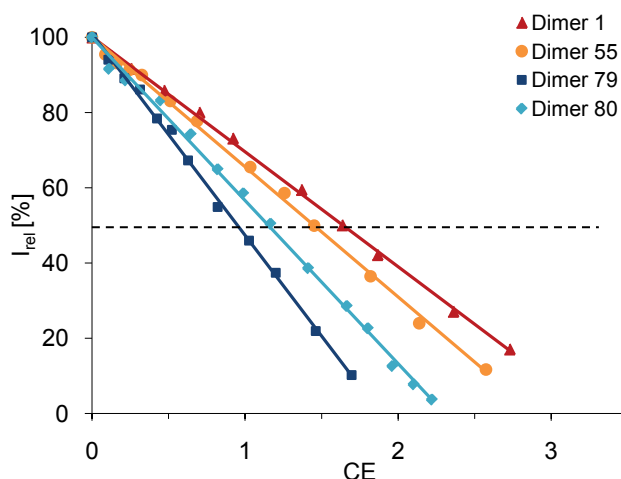


Abbildung 108: DAPI-Verdrängungs-Assay der Dimere **1**, **55**, **79** und **80** mit 20 BP (AT) DNA.

Tabelle 32: C_{50} - und CE_{50} -Werte des DAPI-Verdrängungs-Assays der Dimere **1**, **55**, **79** und **80** mit 20 BP(AT) DNA.

	Dimer 1	Dimer 55	Dimer 79	Dimer 80
Ladung	+2	+2	+2	+2
C_{50} [μ M]	33	29	19	23
CE_{50}	1.7	1.5	1.0	1.2

Insgesamt ist festzuhalten, dass die Dimere **79** und **80** Ethidiumbromid aus 12 BP DNA, sowie DAPI aus AT-DNA besser verdrängen können als Dimer **1**. Hierfür sind wahrscheinlich die zusätzlichen möglichen Wechselwirkungen des Tripyrrolspacers mit den DNA-Basen in Form von Wasserstoffbrückenbindungen, sowie Interaktionen mit dem Phosphatrückgrat verantwortlich. Auch dürften sich die beiden Dimere **79** und **80** durch den langen Spacer und die gekrümmte Form des Tripyrrols gut in die große Furche der DNA einlagern können.

3.6.4 UV-Vis-Schmelzkurven

Die Dimere **55**, **79** und **80** wurden mit 12 und 20 BP DNA auf ihr Vermögen, Doppelstrang-DNA zu stabilisieren getestet. Dazu wurden, wie auch schon für die Dimere **1-7**, jeweils 30 eq. Dimer zu einer 1 mM Hepes-gepufferten DNA-Lösung (Wasser/Methanol 1:1) gegeben und eine UV-Vis-Schmelzkurve über einen Temperaturbereich von 20-85°C bei einer Wellenlänge von 260 nm aufgenommen.

Auch hier zeigten die DNA-Absorptionsintensitäten in den UV-Vis-Spektren mit den Dimeren **55**, **79** und **80** wieder drastische Verschiebungen zu höheren Werten. Dieses Verhalten ging mit inversen Schmelzkurven und einer Erhöhung der Schmelztemperatur für den Komplex einher (Abbildung 109). Alle drei Dimere stabilisieren die DNA-Doppelhelix (mit 12 BP DNA: $T_m = 50-59^\circ\text{C}$, $\Delta T_m = 16-25^\circ\text{C}$). Dabei sind die erhaltenen Werte mit denen der Anilincalixarene **1-6** mit aliphatischen Spacereinheiten vergleichbar.

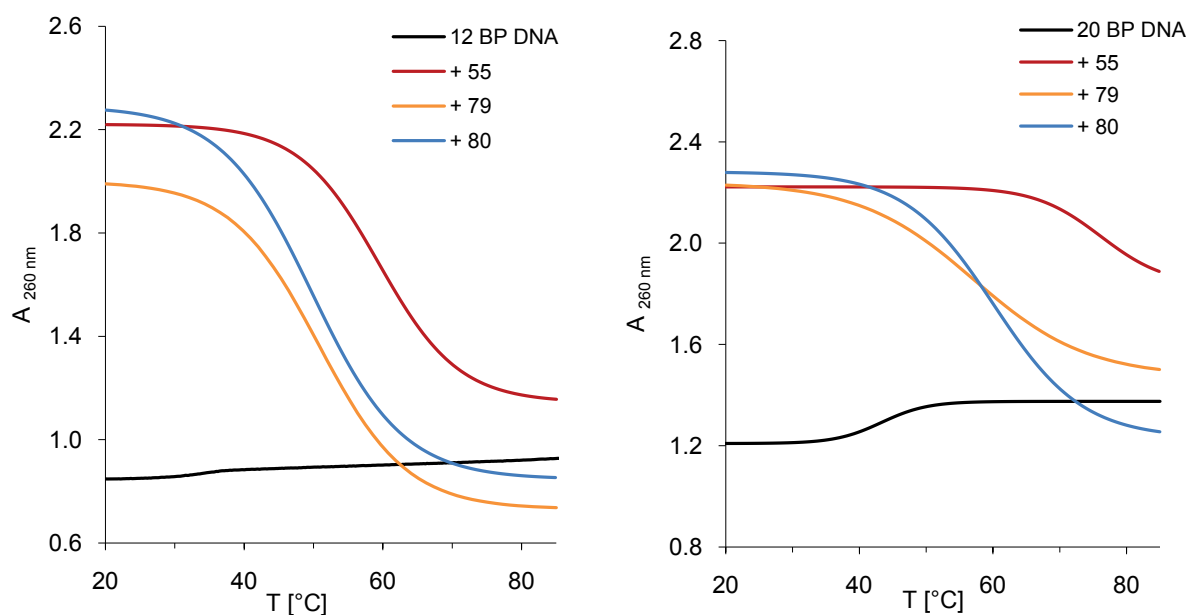


Abbildung 109: UV-Vis-Schmelzkurven der Dimere **55**, **79** und **80** mit 12 BP DNA (links) und 20 BP DNA (rechts).

Die neuen Dimere interagieren offensichtlich, genau wie Dimer **1**, mit den Nucleinbasen-Chromophoren. Diese ungewöhnlichen UV-Vis-Absorptionen des DNA-Dimer-Komplexes und die begleitenden vergrößerten Schmelzkurven können nur durch eine starke nicht-kovalente Interaktion zwischen Ligand und Gastchromophoren erklärt werden. Dabei ist es

naheliegend, dass die Calixaren-Dimere die Nucleinbasen nur durch Bindung in der Furche gut erreichen können.

Tabelle 33: Die durch UV-Vis-spektroskopische Denaturierungsstudien erhaltenen T_m und ΔT_m -Werte für die Dimere **1**, **55**, **79** und **80** mit 12 und 20 BP DNA.

Rezeptor	12 BP DNA*		20 BP DNA [#]	
	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
1	54	20	59	16
55	59	25	76	33
79	51	17	57	14
80	50	16	60	17

*mit T_m (12 BP DNA) = 34°C; [#]mit T_m (20 BP DNA) = 43°C

Interessanterweise sind die gemessenen Schmelzpunkte des Dimers **55** mit nur einer Pyrroleinheit im Spacer am höchsten, für 20 BP DNA wird sogar ein Wert von 76°C erreicht, der dem des Guanidiniumcalixarens **7** nahekommt. Diese Beobachtung könnte damit erklärt werden, dass das Dimer **55**, aufgrund seines kürzeren Spacers, mehr elektrostatische Wechselwirkungen pro DNA-Abschnitt eingehen kann, als die Dimere **79** und **80**. Warum der ΔT_m -Wert allerdings doppelt so groß ist wie für das Dimer **1** kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt werden, der Pyrrolspacer scheint dabei allerdings die entscheidende Rolle zu spielen.

Durch Aufnahme der Schmelzkurven von 20 BP DNA-Doppelsträngen unterschiedlicher Sequenz sollte nochmal untersucht werden, ob eine bestimmte Region bevorzugt stabilisiert werden kann.

Auch hier werden die Polynucleotide allesamt stabilisiert, jedoch kristallisieren sich Unterschiede heraus. Für das Dimer **55** wurden auch hier wieder die höchsten Schmelzpunkte ermittelt, wobei die 20 BP (GC) DNA am stärksten stabilisiert wird. Diese Beobachtung ist ein kleiner Hinweis dafür, dass das Dimer nicht bevorzugt in der kleinen Furche bindet, da sonst die AT-DNA stärker stabilisiert werden müsste. Auch durch die Fluoreszenztitrationen konnte keinerlei AT-Präferenz beobachtet werden.

Die Dimere **79** und **80** vermögen die AT- und GC-reichen Doppelstränge vergleichbar gut zu stabilisieren, jedoch sind die erhaltenen Werte für die 20 BP RNA sehr gering (mit ΔT_m = 69).

Die ermittelten T_m - und ΔT_m -Werte für die Dimere **79** und **80** mit GC-reicher DNA sind etwas niedriger, als für das Dimer **1**. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Bindung der Dimere **79** und **80** nicht so sehr zwischen den beiden DNA-Strängen, sondern bevorzugt an einem Strang stattfindet. In Abbildung 110 sind die Schmelzkurven für die untersuchten Komplexe dargestellt und in Tabelle 34 die Ergebnisse aus diesen Messungen zusammengefasst.

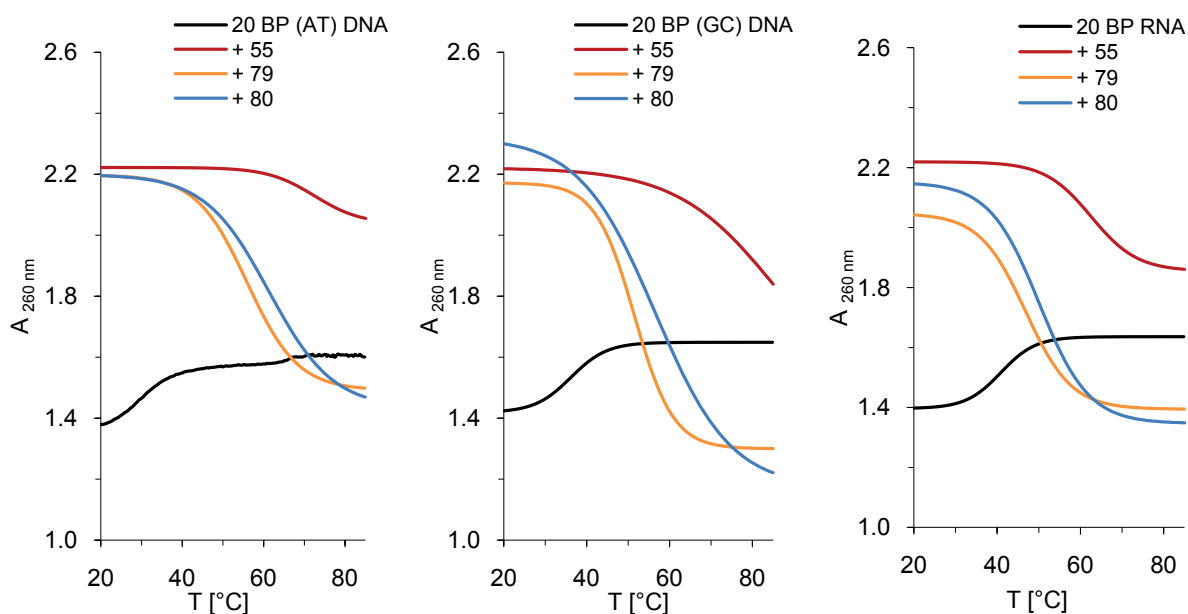


Abbildung 110: UV-Vis-Schmelzkurven der Dimere **55**, **79** und **80** mit 20 BP(AT) DNA (links), 20 BP (GC) DNA (mitte) und 20 BP RNA (rechts).

Tabelle 34: Die durch UV-Vis-spektroskopische Denaturierungsstudien erhaltenen T_m und ΔT_m -Werte für die Dimere **1**, **55**, **79** und **80** mit 20 BP (AT) und (GC) DNA, sowie 20 BP RNA.

Rezeptor	20 BP (AT) DNA*		20 BP (GC) DNA [#]		20 BP RNA ^a	
	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
1	59	28	70	34	64	23
55	72	41	86	50	63	22
79	56	25	52	16	47	6
80	61	30	57	21	50	9

* T_m (20 BP (AT) DNA) = 31°C; [#] T_m (20 BP (GC) DNA) = 36°C; ^a T_m (20 BP RNA) = 41°C

3.6.5 CD-Spektroskopie

Zur Untersuchung der Konformationsänderung von B-DNA im Komplex mit den Dimeren **55**, **79** und **80** wurden CD-Spektren, wie in Kapitel 5.4.5 beschrieben, angefertigt. Die untersuchten Dimere zeigen alleine keine CD-Aktivität.

Im Komplex der 20 BP DNA mit Dimer **55** konnte kein induziertes CD-Signal beobachtet werden. Das Maximum der DNA bei 282 nm blieb gleich. Auch konnte keine Erhöhung der Elliptizität in diesem Bereich beobachtet werden. Der negative Cotton-Effekt wird scheinbar etwas positiver, allerdings wird hier wieder der Bereich gestreift, in dem die Auswertung unter Vorbehalt erfolgen muss, da die UV-Absorption des Dimers unter den verwendeten Konzentrationen zu groß war.

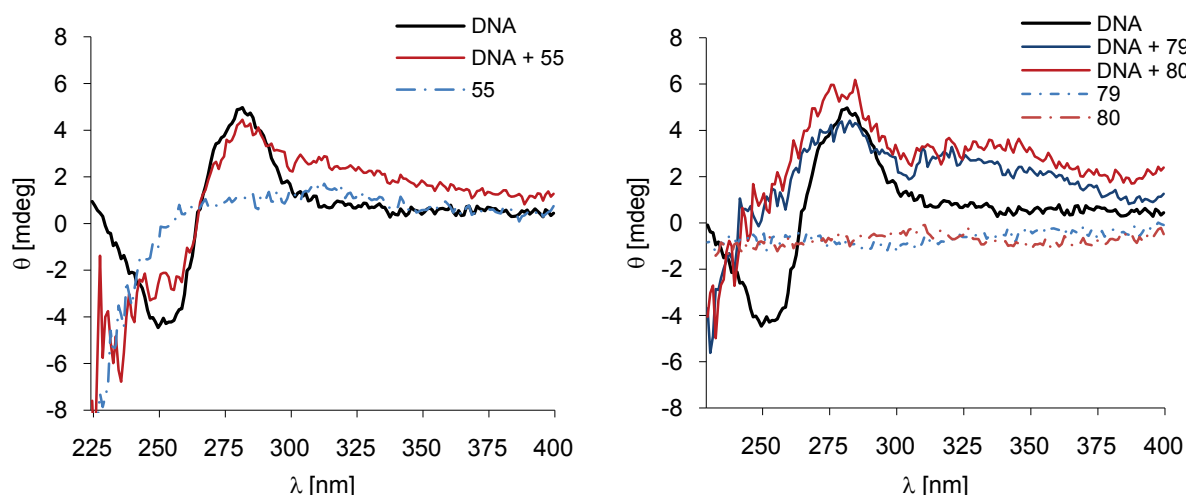


Abbildung 111: CD-Spektren von 20 BP DNA mit **55** (links), **79** und **80** (rechts).

Die beiden Dimere **79** und **80** zeigen sehr ähnliche CD-Spektren. Das Maximum bei 282 nm bleibt bestehen, in diesem Bereich ist kein induzierter CD sichtbar. Allerdings ist die Elliptizität im DNA-Komplex der beiden Dimere im Bereich von 325-330 nm leicht erhöht. Das könnte für ein induziertes CD-Signal der Pyrroleinheiten sprechen, welche in diesem Bereich eine UV-Absorption zeigen. Für die kleine Furche-Binder Distamycin A und Netropsin wurden solche ICD-Signale bei 320 nm beobachtet und mit der Einlagerung des Tripyrrolgerüsts in die kleine Furche erklärt. Dieser Effekt wird durch eine induzierte Chiralität in der Struktur des DNA-Binders ausgelöst.^[199, 200]

Auch der Farbstoff DAPI zeigt einen positiven neuen Cotton-Effekt bei 340 nm, wenn er in der kleinen Furche der DNA bindet.^[131] Da die Geometrie zur Bindung in der kleinen und großen Furche ungefähr gleich ist, legt der hier beobachtete Effekt eine Annäherung in der großen Furche mit dem Tripyrrolspacer der Dimere **79** und **80** nahe. Vielleicht ist dieser Effekt für das Dimer **55** zu klein, da dort nur eine Pyrroleinheit im Spacer vorhanden ist.

3.6.6 Molecular Modelling

Abbildung 112 zeigt eine von dem Programm MacroModel^[162] simulierte Minimumstruktur der möglichen Anordnung des Dimers **80** in der großen Furche von 20 BP DNA. Das Dimer lässt sich durch seinen gekrümmten Spacer optimal in die Furche einfügen. Das Kalottenmodell verdeutlicht noch einmal den Platzbedarf der beiden Calixaren-Kelche. Anhand der minimierten Struktur geht hervor, dass aufgrund des Platzangebotes in der großen Furche ruhig auch zwei oder sogar drei Pyrrolketten zwischen den Calixarenhalbschalen liegen könnten, um Kontakte mit den Basenpaaren auszubilden.

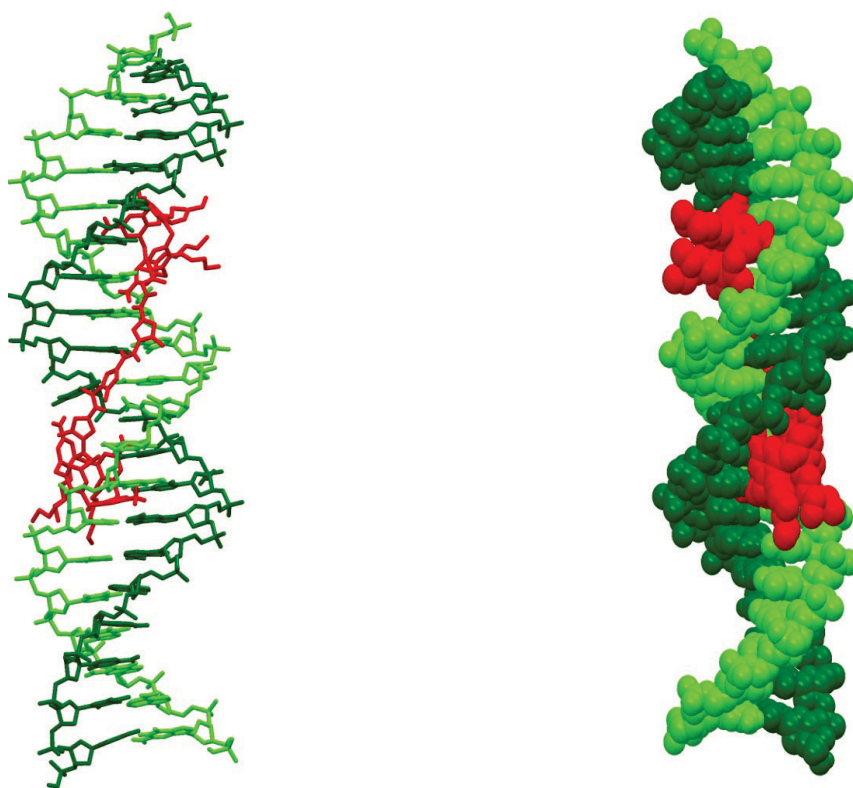


Abbildung 112: Die in einer Monte-Carlo Simulation (MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 1000 Schritte) ermittelte Minimumstruktur von Dimer **80** mit 20 BP DNA; grün: DNA-Stränge; rot: Dimer.

In Abbildung 113 ist ein Ausschnitt der Minimumstruktur von Dimer **80** mit 20 BP DNA dargestellt. Die Amidgruppen des Tripyrrolspacers können zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen mit den DNA-Basen in der großen Furche eingehen.

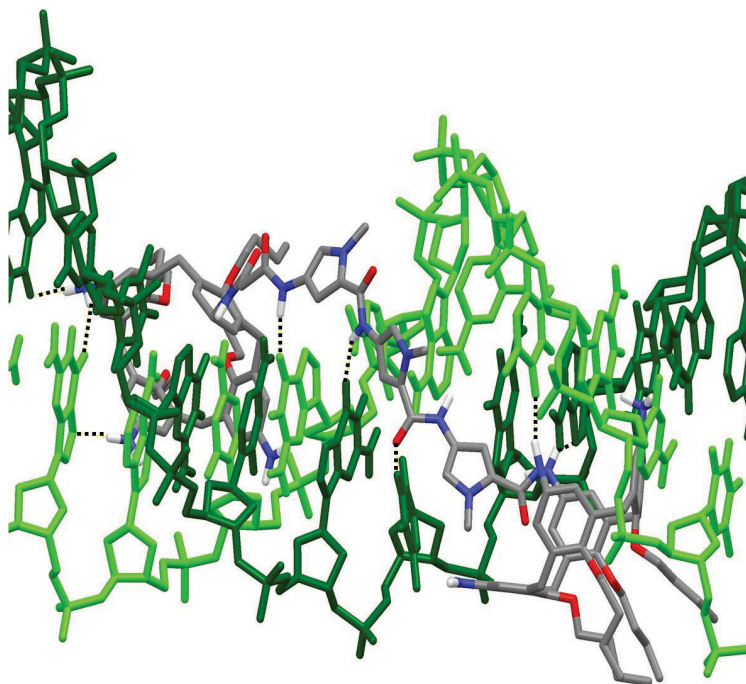


Abbildung 113: Ausschnitt der in einer Monte-Carlo Simulation (MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 1000 Schritte) ermittelten Minimumstruktur von Dimer **80** mit 20 BP DNA; grün: DNA-Stränge.

In Abbildung 114 sind die Minimumstrukturen von Dimer **80** mit AT- und GC-reichen DNA-Strängen gezeigt, und in Abbildung 115 die daraus erhaltenen Ausschnitte, um die berechneten Wasserstoffbrückenbindungen des Spacers zu den Basen darzustellen.

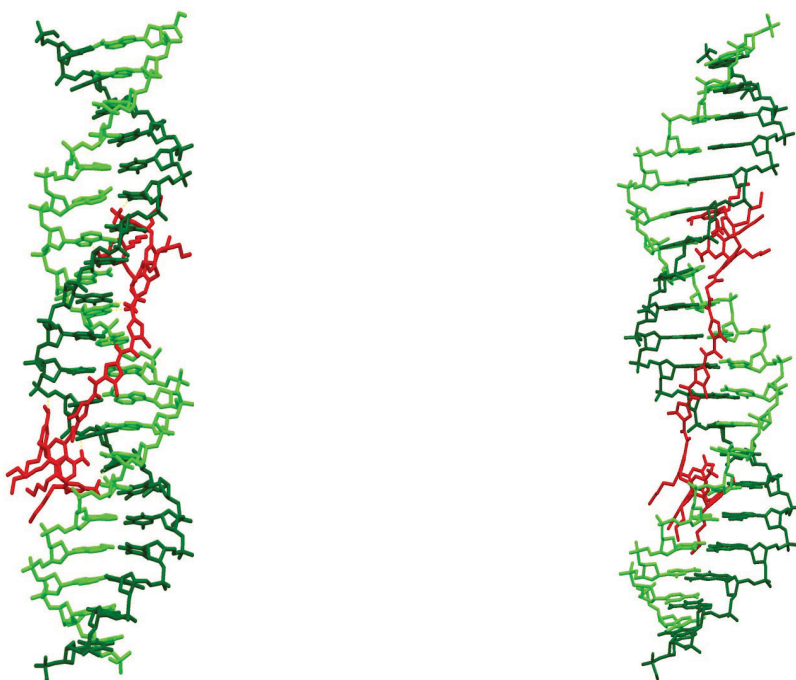


Abbildung 114: Die in einer Monte-Carlo Simulation (MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 1000 Schritte) ermittelte Minimumstruktur von Dimer **80** mit 20 BP (AT) DNA (links) und 20 BP (GC) DNA (rechts); grün: DNA-Stränge; rot: Dimer.

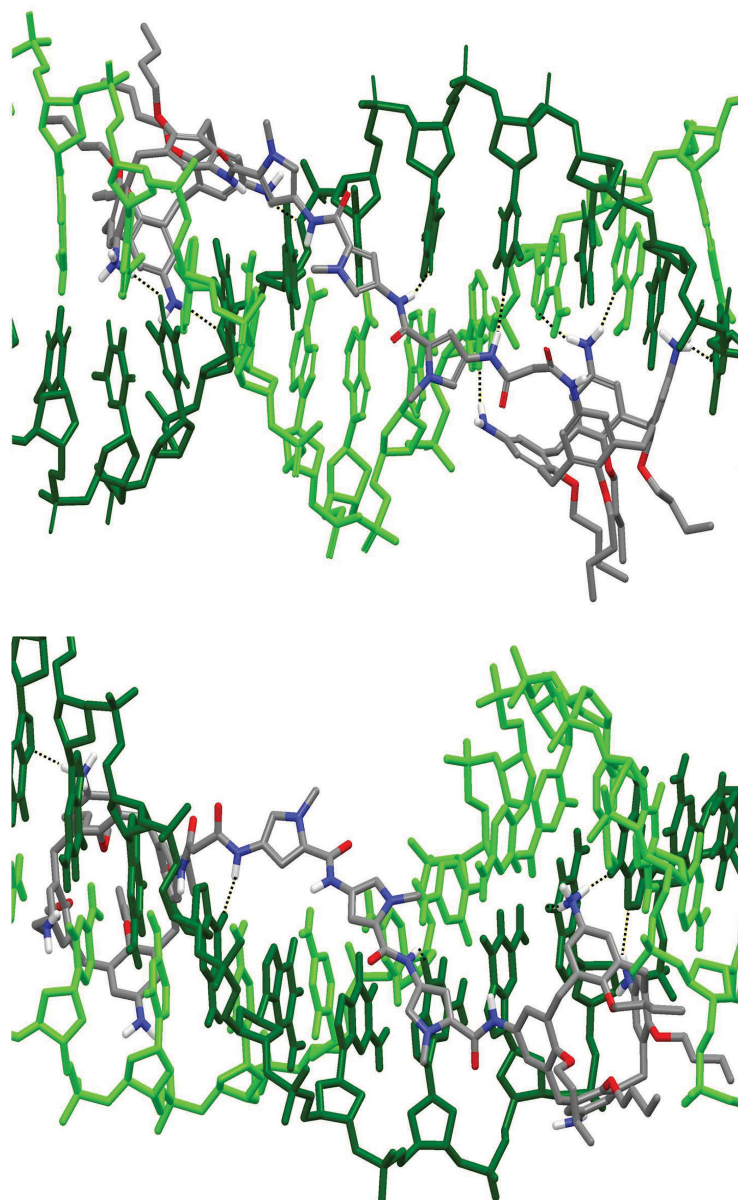


Abbildung 115: Ausschnitt aus den in einer Monte-Carlo Simulation (MacroModel 9.0, OPLS, Wasser, 1000 Schritte) ermittelten Minimumstrukturen von Dimer **80** mit 20 BP (AT) DNA (oben) und 20 BP (GC) DNA (unten); grün: DNA-Stränge.

In AT-DNA bildet der Tripyrrolspacer nur Wasserstoffbrückenbindungen mit einem DNA-Strang aus, und zwar mit den N-H-Gruppen zu dem Carbonylkohlenstoffatom O4 des Thymins. Dagegen erkennen die N-H-Gruppen des Spacers in GC-DNA das Carbonylkohlenstoffatom O6 des Guanins. Die beiden dargestellten Strukturen zeigen allerdings nur eine mögliche Anordnung des Calixaren-Dimers in der großen Furche. Daher sind auch Wasserstoffbrückenbindungen mit den DNA-Basen an anderen Positionen durchaus denkbar.

Unverkennbar ist aber die gute räumliche Anpassung des Dimers **80** in die große Furche der DNA, sowie die möglichen Wasserstoffbrückenbindungen des Spacers zu den DNA-Basen.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Calix[4]aren-Dimere entwickelt, die auf ihre DNA-Affinität untersucht wurden.

Ausgehend von dem Triboc-geschützten Calixaren **13** wurden erfolgreich die Anilincalix[4]aren-Dimere **1-4** mit Alkylspacern unterschiedlicher Länge (C_4 - C_{10}), sowie die Dimere **5** und **6** mit zwei zusätzlichen Ammoniumgruppen in der Spacereinheit synthetisiert. Ausgehend von Dimer **1** konnte das Calixaren-Dimer **7**, mit, bei neutralem pH-Wert stets positiv geladenen Guanidiniumgruppen am oberen Rand, dargestellt werden. Zusätzlich zu diesen Dimeren wurden die beiden korrespondierenden Monomere **M1** mit Anilingruppen und **M7** mit Guanidiniumgruppen hergestellt.

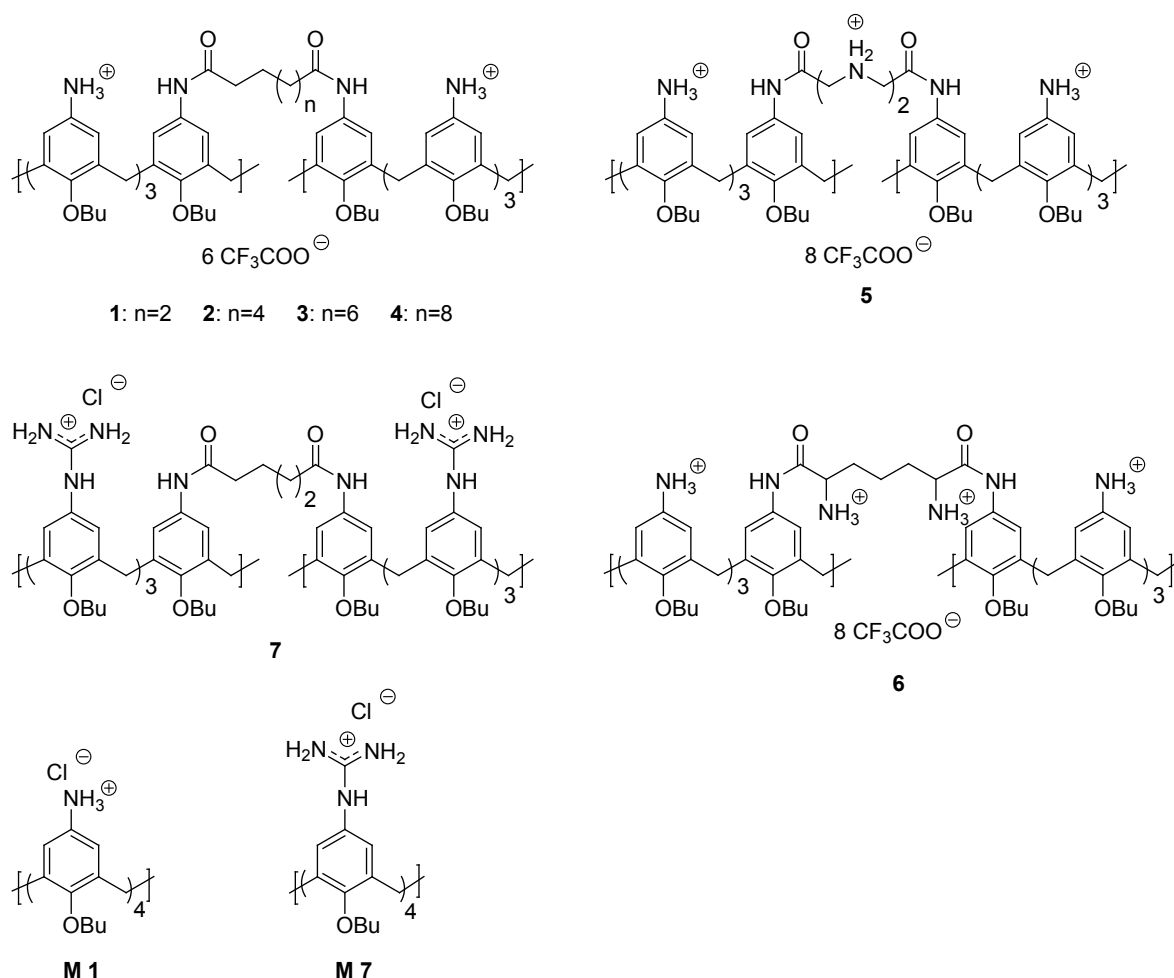


Abbildung 116: Molekülstrukturen der synthetisierten Dimere **1-7** und Monomere **M1** und **M7**.

Die synthetisierten Calixarene wurden mittels Fluoreszenztitrationen mit fluorescein-markierten DNA-Strängen, Ethidiumbromid- und DAPI-Verdrängungs-Assays, thermischen Denaturierungsstudien (UV-Vis-Schmelzkurven) und CD-Spektroskopie auf ihre DNA-Affinität untersucht. Zusätzlich wurde mit Dimer **1** die Bindung an das Dickerson-Dodecamer mittels ^1H -NMR-Spektroskopie untersucht. Durch Monte-Carlo Simulationen sollte eine Vorstellung der möglichen Lage der Rezeptoren in der großen Furche der DNA erhalten werden, sowie die möglichen Wasserstoffbrückenkontakte der Calixarene mit den DNA-Basen gezeigt werden.

Durch Bindungsstudien mit DNA-Doppelsträngen konnte herausgefunden werden, dass eine Verlängerung des Spacers keine Veränderung der DNA-Affinität zur Folge hatte. Die ermittelten Assoziationskonstanten für die Dimere **2-4** liegen mit Werten von $K_a = 10^5 \text{ M}^{-1}$ in derselben Größenordnung, wie für das Dimer **1**.

Die Dimere **5** und insbesondere **6** zeigten, dass die Assoziationskonstante für DNA durch zusätzliche Ammoniumgruppen in der Spacereinheit um eine Größenordnung verbessert werden konnte. Die Ammoniumgruppen können zusätzliche Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen mit den DNA-Basenpaaren eingehen, wie auch durch Monte-Carlo-Rechnungen gezeigt werden konnte.

Alle Dimere **1-6** konnten in die DNA interkaliertes Ethidiumbromid vollständig verdrängen. Dabei wurden besonders für die CE_{50} -Werte niedrige Zahlenwerte erhalten, was auf eine effektive Bindung an die DNA hinweist. Die zusätzlichen positiven Ladungen der Dimere **5** und **6** zeigten einen zusätzlichen Beitrag im Hinblick auf das Verdrängungsvermögen von Ethidiumbromid mit etwas kleineren CE_{50} -Werten, als für **1-4**.

Mit dem Guanidinium-Dimer **7** wurden die größten Assoziationskonstanten mit Doppelstrang-DNA ermittelt ($K_a = 10^7 \text{ M}^{-1}$ für 12 BP DNA). Gleichzeitig wurden nur halb so große Komplexstöchiometrien erhalten, wie für die Anilin-Dimere **1-6**. Ebenso wurden im Ethidiumbromid- und DAPI-Verdrängungs-Assay trotz der erhöhten Ladung von +6 die niedrigsten Werte für die C_{50} - und CE_{50} -Werte erhalten.

Durch die Aufnahme von UV-Vis-Schmelzkurven konnte eine Interaktion der Calixarene mit den DNA-Basen belegt werden. Für die Stabilisierung von 12 und 20 BP DNA-Doppelsträngen wurden hohe ΔT_m -Werte ermittelt. Für die Dimere **1-6** wurden Werte von $\Delta T_m = 16\text{-}24^\circ\text{C}$ gemessen. Das Guanidiniumdimer **7** zeigte mit $\Delta T_m > 42^\circ\text{C}$ die höchste Stabilisation der Komplexe mit 12 und 20 BP DNA.

Im CD-Spektrum konnten für die Dimere **1**, **5**, **6**, und **7** positiv induzierte CD-Signale bei > 280 nm beobachtet werden, die auf eine Bindung in der großen Furche hindeuten.

Die Untersuchung der Dimere **1** und **7** mit AT- und GC-Homonucleotiden, sowie RNA zeigten ebenfalls hohe Assoziationskonstanten und Stabilisierung des jeweiligen Komplexes in den thermischen Denaturierungsstudien. Während Dimer **1** alle drei Polynucleotide ähnlich gut stabilisieren konnte, konnte das Dimer **7** die DNA-Stränge besser stabilisieren als die RNA.

Die Monomere **M1** und **M7** zeigten ebenfalls eine hohe Affinität zu DNA. Die mittels Fluoreszenztitrationen erhaltenen Assoziationskonstanten waren im Fall von **M1** allerdings um eine Größenordnung kleiner als für das Dimer **1**, und im Falle des Monomers **M7** um zwei Größenordnungen niedriger. **M7** zeigt somit eine vergleichbare Bindungsstärke wie das Anilin-Dimer **1**. Dieses Verhalten wurde auch für die folgenden Bindungsstudien beobachtet. Während **M7** Ethidiumbromid vollständig mit ähnlich niedrigen C_{50} - und CE_{50} -Werten, wie Dimer **7**, verdrängt, wurden für **M1** die höchsten CE_{50} -Werte erhalten. Auch bei Untersuchung der thermischen Denaturierung wurden sehr niedrige ΔT_m -Werte für DNA-Komplexe mit **M1** erhalten. Monomer **M7** dagegen vermochte alle DNA-Stränge zu stabilisieren. Interessanterweise konnte RNA durch das Monomer **M1** besser stabilisiert werden als durch **M7**.

Festzuhalten ist, dass durch die Bindungsstudien gezeigt werden konnte, dass sich die Affinität zu DNA durch eine Verlängerung des Alkylspacers nicht verändert. Sowohl die Assoziationskonstanten, Komplexstöchiometrien und Schmelztemperaturen der DNA-Dimer-Komplexe blieben vergleichbar. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Dimere **1-4** einen ähnlichen Bindungsmodus mit DNA besitzen. Durch die Einführung von Ammoniumgruppen in den Spacer können zusätzliche Wechselwirkungen mit der DNA ausgebildet werden, was sich in der Verbesserung der Assoziationskonstanten bemerkbar machte.

Durch die Funktionalisierung der Calixarenhalbschalen am oberen Rand in Form von Guanidiniumgruppen, konnte das sechsfach positiv geladene Dimer **7** synthetisiert werden. Dieses zeigte die höchste Affinität zu DNA mit der größten Assoziationskonstante, sowie den höchsten Schmelzpunkten für 12 und 20 BP DNA. Dieses Verhalten liegt sicherlich in der erhöhten positiven Gesamtladung des Moleküls, sowie durch die möglichen bidentalen Wechselwirkungen der Guanidiniumfunktion mit der DNA begründet. Allerdings könnte die

Bindung dieses hoch geladenen Moleküls an DNA mit einer verstärkten Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat einhergehen.

¹H-NMR-Studien mit dem Dimer **1** und Dickerson-Dodecamer sollten durch Verschiebung der Protonensignale einen Hinweis auf die beteiligten Gruppen bei der Komplexbildung geben. Da die Messungen aufgrund der Wasserunlöslichkeit des Dimers **1** in einem Methanol/Wasser 9:1-Gemisch erfolgen mussten, konnte keine Aussage zu den Protonensignalen der DNA getroffen werden, da diese nicht mehr eindeutig zugeordnet werden konnten. Allerdings konnte beobachtet werden, dass sich die aromatischen Protonensignale des Dimers **1** bei Zugabe des Dickerson-Dodecamers verschieben, während die Signale der Butoxyprotonen annähernd gleich blieben. Diese Beobachtung legt eine Anordnung des Calixarens in der Furche nahe, in der die Anilingroupen zur DNA orientiert sind, und die Butoxygruppen in die Lösung zeigen, was durch Bindung in der großen Furche erreicht werden würde.

Die hohen Komplexstöchiometrien können durch Bildung von Aggregaten der Calixaren-Dimere erklärt werden. Durch GPC-Messungen konnten allerdings keine Aggregate der Dimere in Lösung nachgewiesen werden. Eine Aggregation der Dimere könnte also nur während der Einlagerung in die große Furche der DNA erfolgen.

Auch Monte-Carlo Simulationen zeigen, dass Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amino-, Ammonium- und Guanidiniumgruppen zu den DNA-Basen, sowie zum Phosphatrückgrat eingegangen werden können. Dabei werden bevorzugt das Stickstoffatom N7 des Adenins, der Carbonylkohlenstoff O6 und das Stickstoffatom N7 des Guanins, der Carbonylkohlenstoff O4 des Thymins, sowie das Stickstoffatom N3 des Cytosins erkannt.

Die durchgeführten Untersuchungen liefern insgesamt starke Hinweise, dass die Dimere in der großen Furche der DNA binden. Wahrscheinlich wird diese Bindung noch von anderen Bindungsmodi komplettiert (Aggregation der Dimere, Anlagerung am Rückgrat), die die hohen Komplexstöchiometrien erklären.

In Kooperation mit *I. Piantanida*, *M. Kralj* und *L. Šuman*, Ruđer Bošković Institut, Zagreb, Kroatien, wurden die Calixarene **1**, **4** und **M1** auf ihre antiproliferative Aktivität gegenüber verschiedenen menschlichen Tumorzelllinien überprüft. Während die beiden Dimere **1** und **4** nicht aktiv sind, zeigte das Monomer **M1** eine ziemlich hohe antiproliferative Aktivität. Derzeit ist es noch nicht möglich, klare Rückschlüsse über die Wirkungsweise der untersuchten Verbindung zu ziehen. Es konnte noch nicht geklärt werden, ob **M1** in der Lage ist,

die Zellmembran zu passieren, um dort mit DNA zu interagieren. Denkbar wäre auch, dass das Monomer mit seinen lipophilen Butoxygruppen in die Zellmembran eingelagert wird und dort membranabhängige Transportmechanismen beeinträchtigt und so zur Zellapoptose führt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Calixaren mit Polyglycolgruppen in der *partial cone* Konformation dargestellt werden. Die Synthese von Calixaren-Dimeren mit Polyglycolketten am unteren Rand in *cone*-Konformation, um die Rezeptoren wasserlöslich zu machen, war deswegen nicht möglich. Desweiteren wurde versucht, ein Calixaren-Dimer mit verbrückten Glycolgruppen am unteren Rand, ein sogenanntes Kronencalixaren herzustellen, da dieses in der *cone*-Konformation festgehalten wird. Die Kronencalixarene **36** und **37** wurden erfolgreich synthetisiert, allerdings konnten die Nitrogruppen des Nitrokronencalixarens **37** bisher durch Hydrierung nicht zu den Aminogruppen reduziert werden.

Durch Herstellung der Dimere **55**, **79** und **80** mit Mono- und Tripyrrolspacern konnten die ersten Calix[4]aren-Dimere mit einem Heterozyklenspacer erhalten werden. Die Synthese der beiden Tripyrrolspacer **74** und **75** erfolgte ausgehend von *N*-Methylpyrrol über die beiden Pyrrolmonomere **41** und **42** in 12 Stufen.

Die Dimere **55**, **79** und **80** zeigten ebenfalls eine hohe DNA-Affinität. Durch die Einführung des Tripyrrolspacers ist noch keine Sequenzerkennung möglich, auch werden weder AT- noch GC-reiche DNA-Abschnitte bevorzugt gebunden. Eine Sequenzselektivität konnte allerdings auch noch nicht erwartet werden. Um die gesamte Information in der großen Furche abzulesen, sollten mindestens zwei Tripyrrolketten zwischen zwei Calixarenhalbschalen eingebaut werden, um mehrere und spezifischere Wechselwirkungen ausüben zu können.

Während für Dimer **55** mit einer Pyrroleinheit im Spacer ähnliche Bindungskonstanten bestimmt wurden, wie für Dimer **1**, konnte die DNA-Affinität mit den Dimeren **79** und **80** weiter gesteigert werden. Mit einer $K_a = 10^7 \text{ M}^{-1}$ wurde für AC-reiche DNA mit Dimer **80** der bisher stabilste DNA-Komplex eines Anilindimers erhalten. Da AT-reiche Sequenzen nicht besser gebunden werden als GC-reiche DNA-Regionen, kann eine bevorzugte Einlagerung des Dimers in die kleine Furche der DNA weitestgehend ausgeschlossen werden, da die Tripyrroleinheit eine Präferenz für AT-reiche Abschnitte in der kleinen Furche besitzt.

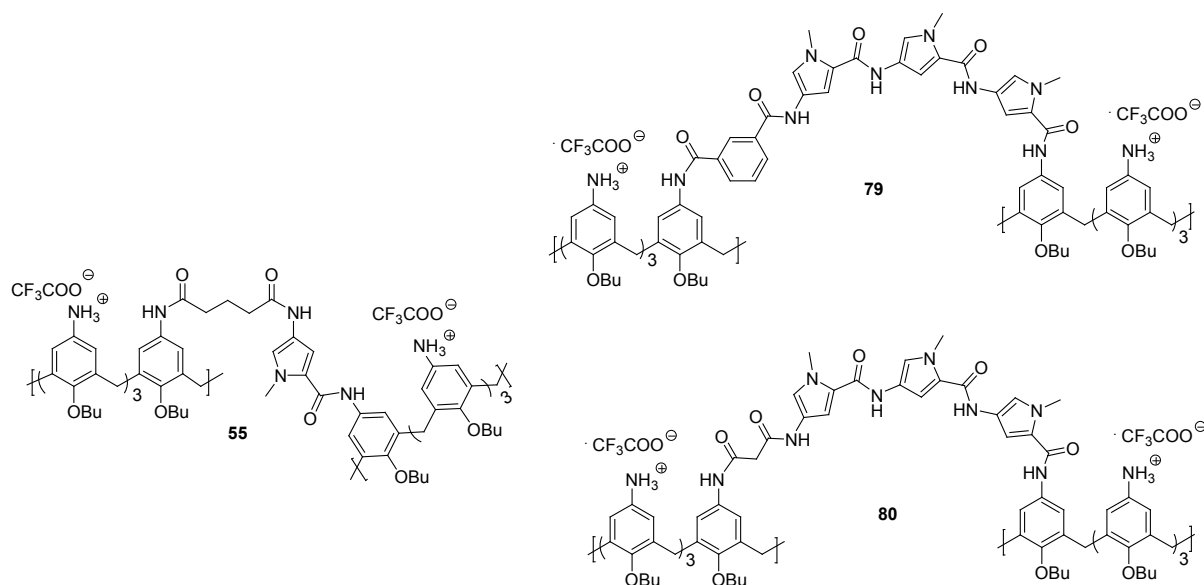


Abbildung 117: Molekülstrukturen der Dimere **55**, **79** und **80**.

Die gemessenen DNA-Schmelzkurven weisen auch für die Dimere **55**, **79** und **80** einen inversen Verlauf mit stark erhöhten Schmelzpunkten auf. Die CD-Spektren zeigen allerdings keine induzierten CD-Signale in einem Bereich von 280 nm. Es wird um 320 nm eine breite positive Bande im CD-Spektrum erhalten, die auf einen induzierten Effekt der DNA-Chromophore mit den Pyrrolringen hinweist, was wiederum mit einer Einlagerung in der großen Furche und Ausbildung von Kontakten zu den Basenpaaren erklärt werden könnte.

Auch die Minimumstrukturen aus den Monte-Carlo Simulationen für das Dimer **80**, welches unter den Anilincalixarenen den stabilsten DNA-Komplex ausbildet, zeigt, dass sich das Dimer mit seinem gebogenen Spacer gut an die gekrümmte Form der DNA anpassen, und Wasserstoffbrückenbindungen mit den DNA-Basen eingehen kann. Diese Beobachtungen sind sehr vielversprechend im Hinblick darauf, in Zukunft mit diesen Systemen eine sequenzspezifische DNA-Erkennung zu erreichen.

Da die sequenzspezifische Erkennung in der großen Furche der DNA in der Natur nach keinem erkennbaren Muster verläuft, ist eine sequenzspezifische Erkennung der DNA durch künstliche Rezeptoren ein schwer zu erreichendes Ziel. Durch weitere Modifikationen der in

dieser Arbeit dargestellten Calixarendimere soll in Zukunft versucht werden, sich weiter an das Ziel, in die Genexpression einzugreifen, zu nähern.

Anhand der Fluoreszenztitrationen konnte bereits gezeigt werden, dass besonders das Dimer **6** mit zusätzlichen Ammoniumgruppen im Spacer, die beiden Dimere **79** und **80** mit Tripyrrol-spacern und das Dimer **7** mit Guanidiniumgruppen an den Calixarenhalbschalen hohe DNA-Affinitäten aufweisen.

Durch Monte-Carlo Simulationen konnte die mögliche Einlagerung des Dimers **80** in der großen Furche, und die dortigen Wechselwirkungen mit den DNA-Basen veranschaulicht werden. Um noch effektiver mit der DNA zu interagieren, sollen in Zukunft längere Heterozyklenspacer eingeführt werden. Durch die Verwendung von Imidazol und Hydroxypyrrrol in der Spacerkette könnten weitere Wechselwirkungen mit den DNA-Basen induziert werden, was zu einer bevorzugten Bindung einer bestimmten DNA-Region in der großen Furche führen könnte.

Sehr vielversprechend ist darüberhinaus, analog zu den entwickelten Hairpinmolekülen zur DNA-Erkennung in der kleinen Furche, die Einführung zwei- oder dreikettiger Heterozyklenspacer zwischen zwei Calixarenhalbschalen (Abbildung 118). Durch solche mehrkettigen Spacer könnten ganze Basenpaare erkannt werden.

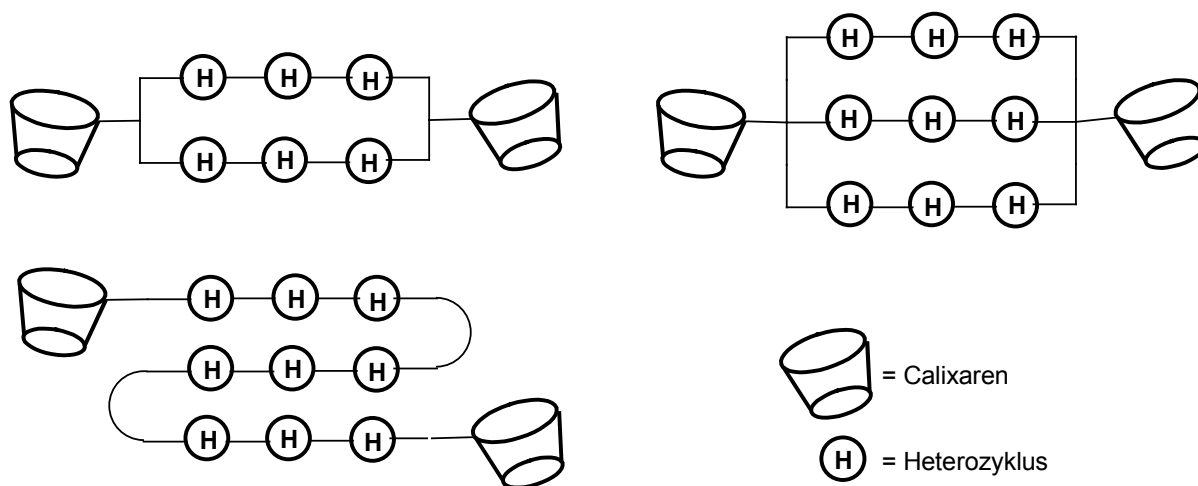


Abbildung 118: Schematische Darstellung von zwei- oder dreikettigen Heterozyklusspacern.

Der zweikettige Spacer könnte aus den in Abbildung 119 gezeigten Strukturelementen hergestellt werden.

Als Calixareneinheiten könnten auch die Benzylammonium- und Benzylguanidiniumderivate verwendet werden. Der Vorteil dieser von *W. Hu* dargestellten Calixarene besteht in der permanenten positiven Ladung der Aminogruppen am oberen Rand bei neutralem pH-Wert, sowie der Wasserlöslichkeit. Es ist interessant zu untersuchen, in wie weit sich die Eigenschaften der Benzylammoniumcalixarene mit Heterozyklenspacer gegenüber den Dimeren **79** und **80** unterscheiden und ob die DNA-Affinität noch weiter verbessert werden kann.

Durch Synthese der oben erwähnten potentiellen künstlichen Rezeptoren und Untersuchung der Bindungseigenschaften durch Screening einer Bibliothek von DNA-Strängen mit verschiedenen Basensequenzen, sollte ein weiterer großer Schritt zu einer sequenzselektiven DNA-Erkennung in der großen Furche möglich sein.

Eine weitere wichtige Herausforderung bleibt in diesem Zusammenhang die Synthese von Anilincalixaren-Dimeren mit Polyglycolketten am unteren Rand in *cone*-Konformation, um die Rezeptoren wasserlöslich zu machen und Bindungsstudien in wässriger gepufferter Lösung zu ermöglichen. Durch Synthese eines Kronencalixarens mit Glycolgruppen am unteren Rand wird die *cone* Konformation in jedem Fall fixiert. Ein Aminokronencalixaren sollte durch das Ausprobieren verschiedener Reaktionsbedingungen zugänglich sein. Im weiteren Syntheseverlauf müssen die Aminogruppen allerdings dreifach Boc-geschützt werden. Da die Kronencalixarene sehr reaktionsträge und die Ausbeuten eher niedrig sind, wird es wahrscheinlich schwierig, aber nicht unmöglich sein, ein dreifach Boc-geschütztes Kronencalixaren in guter Ausbeute darzustellen. Die Kupplungsreaktion mit einem geeigneten Spacer (zunächst Adipinsäure) und anschließende Abspaltung der Schutzgruppen würde dann ein Kronencalixaren-Dimer liefern.

Interessant wäre, wie ein solches Kronencalixaren-Dimer die Bindungseigenschaften zu DNA beeinflusst, und ob die kurzen überbrückten Glycoleinheiten am unteren Rand ausreichen, das Molekül wasserlöslich zu machen. Ebenfalls könnte mittels Durchführung von Bindungsstudien dieses Calixarens mit DNA der Beitrag der Butoxygruppen von den bisher dargestellten Dimeren auf die DNA-Bindung untersucht werden.

5. Experimenteller Teil

5.1 Materialien

▪ Chemikalien

Die in der Synthese eingesetzten Chemikalien wurden über die Firmen *Sigma Aldrich Chemical Co.* (München), *Bachem* (Bubendorf/Schweiz), *Fluka* (Taufkirchen), *Acros Organics* (Geel/Belgien), *Lancaster Synthesis* (Frankfurt/Main) und *Novabiochem* (Schwalbach) in den Qualitäten *purris.*, *purrum* oder *p.a.* erworben.

▪ DNA- und RNA-Moleküle

Die verwendeten DNA- und RNA-Doppelstränge wurden als Einzelstränge über die Firma *Metabion international AG* (Martinsried) bezogen.

▪ Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel wurden über die Firmen *Fluka* (Taufkirchen) und *Aldrich Chemical Co.* (Taufkirchen) in der Qualität *purris.* und *anhydrous* erworben und über Molekularsieb gelagert oder vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach Standardmethoden absolutiert.^[201, 202]

Die für die NMR-Spektroskopie verwendeten Lösungsmittel wurden über die Firma *Aldrich Chemical Co.* bezogen und über Molsieb gelagert.

Das eingesetzte Wasser war entionisiert und wurde im Bedarfsfall nochmals über eine PURELAB UHQ Anlage der Firma *ELGA Lab Water* (Celle) entionisiert (Bidest. Wasser).

▪ Chromatographie

Bei der Dünnschichtchromatographie kamen *Polygram SIL G/UV₂₅₄* Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator der Firma *Roth* (Karlsruhe) zum Einsatz. Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlängen $\lambda = 254$ nm und 366 nm verwendet.

Die präparative Säulenchromatographie wurde an Kieselgel 60 der Firma *Fluka* (Taufkirchen) durchgeführt. Die verwendeten Laufmittelgemische und die erhaltenen R_F -Werte sind im Syntheseteil 5.3. bei den entsprechenden Synthesevorschriften vermerkt.

▪ Verwendete Puffer

Als Puffer für die Bindungsstudien der Dimere und Monomere mit DNA- und RNA-Doppelsträngen wurden folgende mit Hepes-gepufferte Wasser/Methanol 1:1-Gemische verwendet:

1 mM Hepes Wasser/Methanol 1:1, pH 7.1

Hierzu wurden 0.119 g Hepes in 250 mL bidest. Wasser gelöst, mit 250 mL Methanol p.a. versetzt und mit 2 M NaOH auf pH 7.1 eingestellt.

2 mM Hepes Wasser/Methanol 1:1, 9.4 mM NaCl, pH 7.1

0.238 g Hepes und 0.270 g NaCl wurden in 250 mL bidest. Wasser gelöst, mit 250 mL Methanol p.a. versetzt und mit 2 M NaOH auf pH 7.1 eingestellt.

2 mM Hepes Wasser/Methanol 1:1, 150 mM NaCl, pH 7.1

0.19 g Hepes und 3.50 g NaCl wurden in 200 mL bidest. Wasser gelöst, mit 200 mL Methanol p.a. versetzt und mit 2 M NaOH auf pH 7.1 eingestellt.

5.2 Methoden

▪ Kernresonanz-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektren wurden mit folgenden Geräten gemessen:

Bruker DRX-500 (^1H , ^{13}C , DEPT 90, DEPT 135, gs-COSY 90, gs-HMQC, gs-HMBC (5 mm QNP und 5 mm TBI Probenkopf))

Bruker DMX-300 (^1H , ^{13}C , DEPT 135, DEPT 90 (5 mm QNP Probenkopf))

In den ^1H -NMR-Spektren beziehen sich die angegebenen chemischen Verschiebungen δ auf das Restprotonensignal des verwendeten deuterierten Lösungsmittels. In den ^{13}C -NMR-Spektren wurde auf das ^{13}C -Signal des verwendeten Lösungsmittels kalibriert. Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgt in parts per million (ppm). Die eingesetzten deuterierten Lösungsmittel sind in den jeweiligen Spektren vermerkt. Alle ^{13}C -NMR-Spektren wurden Breitband-entkoppelt gemessen.

Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Die Beschreibung der Spinmultiplizitäten erfolgt folgendermaßen: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, m = Multiplett, t = Triplett, dt = Dublett vom Triplett, q = Quartett, qt = Quintett, sext = Sextett, bs = breites Signal. Zusätzlich zur Multiplizität ist die integrierte Protonenzahl angegeben. Die genauere Zuordnung der Signale wurde mit Hilfe von 2D-NMR-Experimenten vorgenommen.

▪ Massenspektroskopie

Die hochaufgelösten Massenspektren mit Elektrospray-Ionisation (ESI HR-MS) wurden unter Verwendung eines Bruker BioTOF III Massenspektrometers gemessen. Die Messmethode wird im jeweiligen Analytikteil neben dem Lösungsmittel in Klammern angegeben. Angegeben sind jeweils die m/z -Werte der wichtigsten Signale.

- **UV-Vis-Spektroskopie**

Für die Messungen der UV-Vis-Spektren wurde das FP-6500 Spektrophotometer der Firma *Jasco* (Groß-Umstadt) verwendet.

- **Fluoreszenz-Spektroskopie**

Für die Fluoreszenzmessungen wurde das FP-6500 Spektrofluorometer der Firma *Jasco* (Groß-Umstadt) verwendet.

- **CD-Spektroskopie**

Für die Aufnahme der CD-Spektren wurde das J-810 Spektropolarimeter der Firma *Jasco* (Groß-Umstadt) verwendet.

- **Schmelzpunkte**

Zur Bestimmung der Schmelzpunkte von Feststoffen wurde das Schmelzpunktmessgerät Melting Point B-540 der Firma *Büchi Labortechnik GmbH* (Essen) verwendet.

- **Gefriertrocknung**

Für die Gefriertrocknung wasserhaltiger Proben wurde die Gefriertrocknungseinheit Alpha 2-4 LSC der Firma *Christ* (Osterode am Harz) verwendet.

- **Thermomixer**

Zur Hybridisierung zweier DNA-Einzelstränge zu einem Doppelstrang wurde der Thermomixer compact der *Eppendorf AG* (Hamburg) verwendet.

▪ **Vortexer**

Zum Schütteln (Vortexen) von Probenlösungen wurde der Stuart Vortex Mixer SA8 der Firma *Bibby Scientific Limited* (Staffordshire, UK) verwendet.

▪ **pH-Meter**

Zur pH-Wert-Einstellung der Pufferlösungen und pH-Wert-Bestimmungen der Proben wurde das inoLab pH Level1 pH-Meter der Firma *WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH* (Weilheim) verwendet.

▪ **DNA- und RNA-Hybridisierung**

Die gefriergetrockneten DNA- und RNA-Einzelstränge wurden mit definierten Puffer-Volumina versetzt, um jeweils 100 μM Einzelstrang-Lösungen zu erhalten. Von den Lösungen zweier komplementärer Einzelstränge wurden gleiche Volumina in ein Eppendorfgefäß zusammenpipettiert. Diese Lösung wurde im Thermomixer für 5 min auf 90°C erhitzt und langsam wieder auf RT abgekühlt. Auf diese Weise wurden 50 μM DNA- bzw. RNA-Doppelstranglösungen erhalten.

Um zu überprüfen, ob sich der DNA-Doppelstrang gebildet hat, wurde anschließend eine DNA-Schmelzkurve (UV-Vis) aufgenommen. Die Durchführung wird in Kapitel 5.4.4 beschrieben.

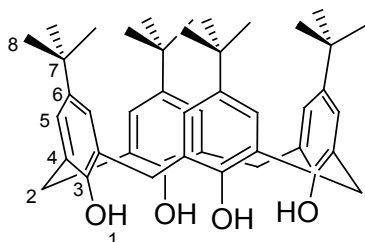
▪ **Gelpermeabilitätschromatographie (GPC)**

Bei der Gelpermeabilitätschromatographie kam neben einer Jasco HPLC Pumpe PU-980 ein UV-Detektor Jasco UV-2070 und ein RI Detektor Jasco Intelligent RI-930 zum Einsatz. Als Säulenmaterial wurden zwei HEMA Bio Linear 10 μ 8x300 nm verwendet. Die Proben wurden als 1 mL Lösungen mit einer Konzentration von 2 mg/mL in Wasser/Methanol 1:1 mit 0.01 M Natriumazid vorbereitet und bei 30°C gemessen.

5.3 Synthesen

5.3.1 Synthese der monomeren Calix[4]arene

Darstellung von *p*-tert.-Butylcalix[4]aren **9**^[139]

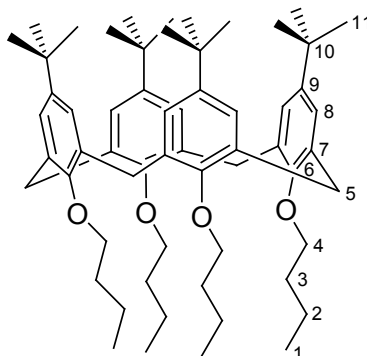


Durchführung:

25.0 g *p*-tert.-Butylphenol **8** (0.166 mol, 1.0 eq.), 15.6 mL 37%ige Formaldehydlösung (0.200 mol, 1.2 eq.) und 0.3 g NaOH (7.5 mmol, 0.045 eq.) werden im Argon-Gegenstrom 2 h bei 120°C im offenen Kolben gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf RT abgekühlt, mit 325 mL (warmen) Diphenylether versetzt und 1 h gerührt. Das Gemisch wird zuerst auf 120°C, später bis auf 185°C erhitzt und das dabei entstehende Wasser durch Einleitung eines starken Argon-Stroms entfernt. Bei abnehmender Wasserentwicklung und beginnendem Ausfall eines Niederschlages wird ein Rückflusskühler aufgesetzt und der Kolbeninhalt unter Rückfluss 3.5 h gekocht. Nach Abkühlung der Reaktionsmischung auf RT (Eisbad) wird diese mit 400 mL Ethylacetat versetzt, 30 min gerührt und 30 min stehen gelassen. Der entstandene weiße Niederschlag wird abfiltriert und nacheinander mit Ethylacetat (2x 25 mL), Essigsäure (50 mL), Wasser (2x 25 mL) und Aceton (2x 15 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wird aus 360 mL Toluol umkristallisiert und im HV getrocknet. Es werden 15.0 g (0.023 mol) Produkt in Form von weiß-glänzenden Kristallen erhalten.

Ausbeute: 56%. **Schmp.:** 342-344°C. **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.23 (s, 36 H, H-8), 3.52 (d, 4 H, H-2, ²J = 13.6 Hz), 4.28 (d, 4 H, H-2, ²J = 13.0 Hz), 7.07 (s, 8 H, H-5), 10.36 (s, 4 H, H-1). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₄₄H₅₆NaO₄]⁺: *m/z* 671.4071, gef.: *m/z* 671.4035.

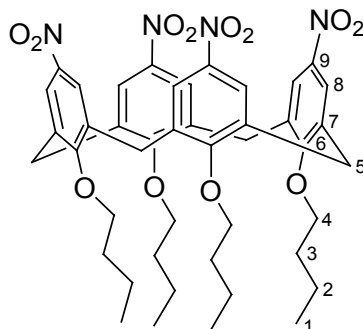
Darstellung von 5,11,17,23-Tetra-*tert*.-butyl-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren **10**^[140]



Durchführung:

3.6 g Natriumhydrid (93.0 mmol, 12.0 eq.) werden mit abs. *n*-Hexan (3x 50 mL) gewaschen, mit 200 mL abs. DMF und 5.0 g *p*-*tert*.-Butylcalix[4]aren **9** (7.7 mmol, 1.0 eq.) versetzt und 1 h bei 70°C gerührt. Über 45 min hinweg werden 10.0 mL 1-Brombutan (93.0 mmol, 12.0 eq.) zugetropft und das Reaktionsgemisch 19 h bei 70°C gerührt. Die entstandene klare Lösung wird langsam auf RT abgekühlt und über Nacht stehen gelassen. Der ausgefallene helle Niederschlag wird abfiltriert, mit Methanol (3x 25 mL) gewaschen und im HV getrocknet. Es werden 4.91 g (5.6 mmol) **10** als weißer Feststoff erhalten.

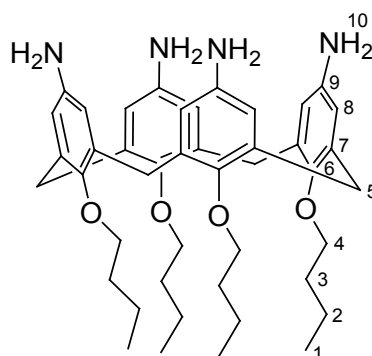
Ausbeute: 73%. **Schmp.:** 166°C. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.02 (t, 12 H, H-1, $^3J = 7.4$ Hz), 1.08 (s, 36 H, H-11), 1.45 (sext, 8 H, H-2, $^3J = 7.7$ Hz), 2.01 (qt, 8 H, H-3, $^3J = 7.7$ Hz), 3.11 (d, 4 H, H-5, $^2J = 12.5$ Hz), 3.86 (t, 8 H, H-4, $^3J = 7.6$ Hz), 4.42 (d, 4 H, H-5, $^3J = 12.4$ Hz), 6.78 (s, 8 H, H-8). **¹³C-NMR** (126.5 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.33 (C-1), 19.54 (C-2), 31.21 (C-5), 31.62 (C-11), 32.54 (C-3), 33.95 (C-10), 75.30 (C-4), 125.01 (C-8), 134.00 (C-7), 144.27 (C-9), 153.92 (C-6). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₆₀H₈₈NaO₄]⁺: m/z 895.6575, gef.: m/z 895.6607.

Darstellung von 5,11,17,23-Tetranitro-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren **11**^[141]**Durchführung:**

4.9 g Butoxycalix[4]aren **10** (5.6 mmol, 1.0 eq.) werden in 55 mL abs. DCM gelöst und mit 55 mL Essigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wird auf 0°C abgekühlt und über 45 min 19.0 mL Salpetersäure (442.0 mmol, 79.0 eq.) hinzu getropft. Die Reaktionsmischung wird 5 min bei 0°C, dann 2.5 h bei RT gerührt und mit 400 mL Wasser versetzt. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase mit DCM (3x 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser (3x 150 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird in DCM gelöst und unter Rühren mit 12 mL Methanol ausgefällt. Nach Abfiltrieren und Trocknen im HV werden 3.09 g (3.73 mmol) des Produktes **11** als hellgelbes Pulver erhalten.

Ausbeute: 66%. **Schmp.:** 305-306°C. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.01 (t, 12 H, H-1, $^3J = 7.4$ Hz), 1.45 (sext, 8 H, H-2, $^3J = 7.7$ Hz), 1.87 (qt, 8 H, H-3, $^3J = 7.6$ Hz), 3.40 (dd, 4 H, H-5, $^2J = 14.1$ Hz), 4.00 (t, 8 H, H-4, $^3J = 7.5$ Hz), 4.52 (dd, 4 H, H-5, $^2J = 14.0$ Hz), 7.58 (s, 8 H, H-8). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.06 (C-1), 19.31 (C-2), 31.28 (C-3), 32.30 (C-5), 76.10 (C-4), 124.18 (C-8), 135.56 (C-7), 143.08 (C-9), 161.79 (C-6). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₄₄H₅₂N₄NaO₁₂]⁺: m/z 851.3474, gef.: m/z 851.3504.

Darstellung von 5,11,17,23-Tetra-amino-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren **12**^[141]

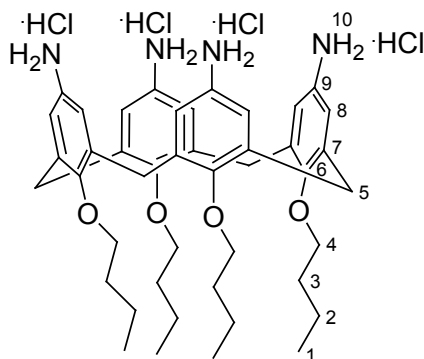


Durchführung:

2.60 g Nitrocalix[4]aren **11** (3.14 mmol, 1.0 eq.) werden in 160 mL MeOH gelöst, mit 0.26 g Pd/C versetzt und 24 h bei RT hydriert. Die Suspension wird über Celite filtriert und mit MeOH (3x 150 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wird entfernt und der erhaltene Feststoff im HV getrocknet. Es werden 2.23 g (3.13 mmol) des Produkts **12** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: quant. **Schmp.:** 167-169°C (Zers.). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.96 (t, 12 H, H-1, 3J = 7.5 Hz), 1.40 (sext, 8 H, H-2, 3J = 7.6 Hz), 1.82 (qt, 8 H, H-3, 3J = 7.6 Hz), 2.91 (dd, 4 H, H-5, 2J = 16.0 Hz), 3.61 (bs, 8 H, H-10), 4.75 (t, 8 H, H-4, 3J = 7.5 Hz), 4.31 (dd, 4 H, H-5, 2J = 15.9 Hz), 6.08 (s, 8 H, H-8). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.23 (C-1), 19.50 (C-2), 31.25 (C-3), 32.33 (C-5), 74.90 (C-4), 116.26 (C-8), 135.94 (C-7), 138.51 (C-9), 150.52 (C-6). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₄₄H₆₂N₄O₄]⁺: m/z 709.4687, gef.: m/z 709.4671.

Darstellung von 5,11,17,23-Tetra-amino-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-tetrahydrochlorid **M1^[101]**



Durchführung:

0.10 g Aminocalixaren **12** (0.14 mmol, 1.0 eq.) werden in 10 mL abs. DCM gelöst, mit 5 mL konz. HCl versetzt und 24 h bei RT gerührt. Der entstandene helle Niederschlag wird abfiltriert und im HV getrocknet. Es werden 0.103 g (0.121 mmol) **M1** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 86%. **Schmp.:** 264°C (Zers.). **¹H-NMR** (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 1.04 (t, 12 H, H-1, ³*J* = 7.4 Hz), 1.51 (sext, 8 H, H-2, ³*J* = 7.7 Hz), 1.94 (qt, 8 H, H-3, ³*J* = 7.6 Hz), 3.34 (d, 4 H, H-5, ²*J* = 13.4 Hz), 3.97 (t, 8 H, H-4, ³*J* = 7.4 Hz), 4.53 (d, 4 H, H-5, ²*J* = 13.5 Hz), 6.83 (s, 8 H, H-8). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 14.56 (C-1), 20.59 (C-2), 31.74 (C-3), 33.61 (C-5), 76.87 (C-4), 124.55 (C-8), 126.09 (C-9), 137.81 (C-7), 158.09 (C-6). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₄₄H₆₁N₄O₄]⁺: *m/z* 709.4687, gef.: *m/z* 709.4735, ber. für [C₄₄H₆₀N₄NaO₄]⁺: *m/z* 731.4507, gef.: *m/z* 731.4552.

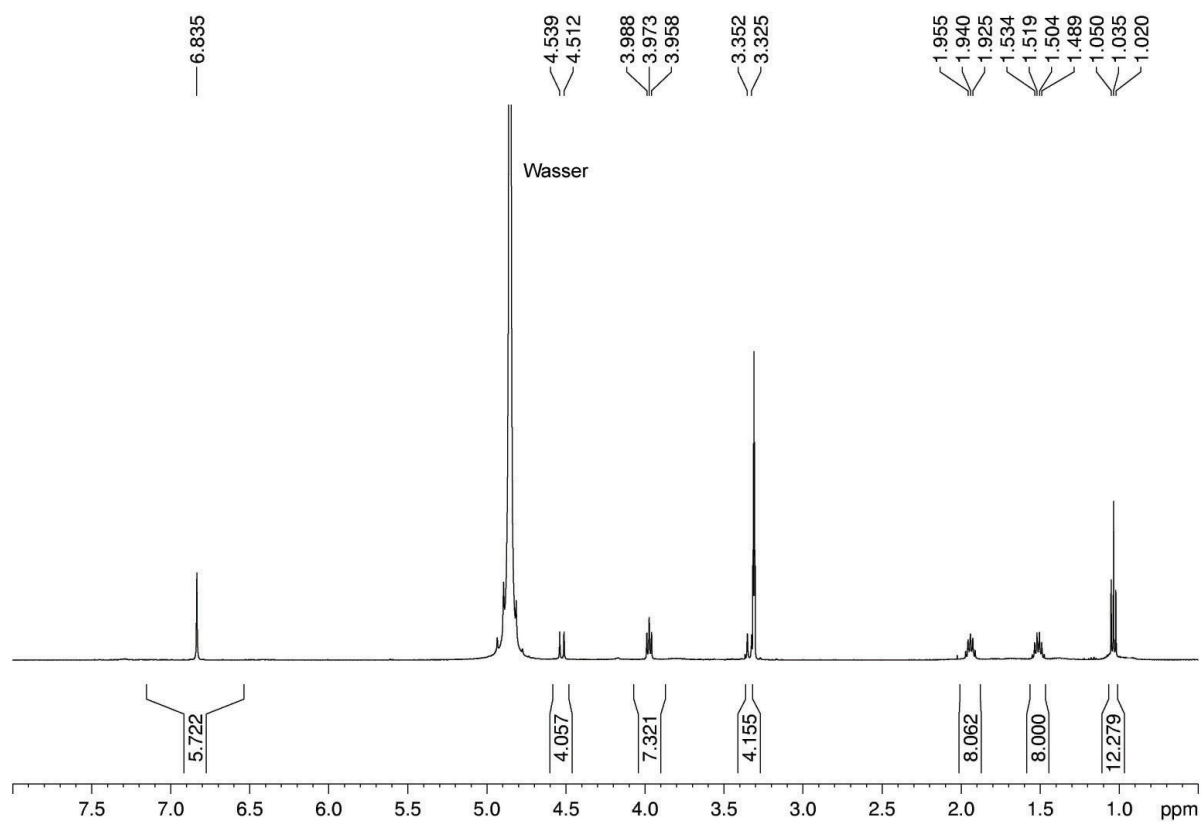
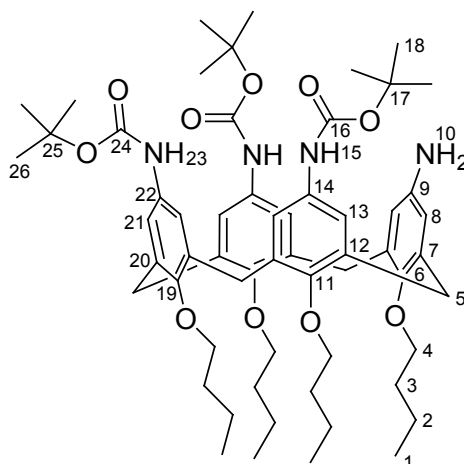


Abbildung 121: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, MeOH-d_4) von **M1**.

Darstellung von 5,11,17-Tris[(*tert.*-butoxycarbonyl)-amino]-23-amino-25,26,27,28-tetra-butoxycalix[4]aren **13^[142]**

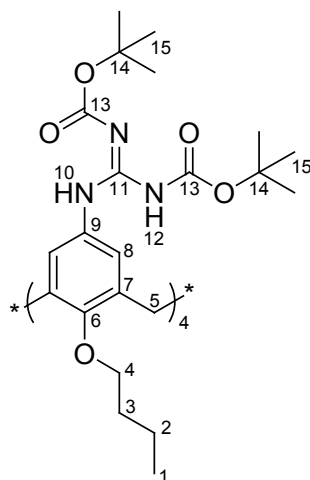


Durchführung:

2.0 g Tetraaminotetrabutoxycalix[4]aren **12** (2.6 mmol, 1.0 eq.) werden in 150 mL abs. DCM gelöst. Über 30 min werden 1.73 g Di-*tert.*-butyldicarbonat (7.84 mmol, 3.0 eq.), gelöst in 20 mL abs. DCM, zugetropft und die Reaktionsmischung 18 h bei RT gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, CH/EA = 3:1) gereinigt. Es werden 1.47 g (1.46 mmol) des Produktes **13** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 56%. **Schmp.:** 128°C. **R_f:** 0.12 (CH/EA = 3:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.96 (m, 12 H, H-1), 1.27 (m, 4 H, H-2), 1.42 (s, 9 H, H-26), 1.52 (m, 4 H, H-2), 1.53 (s, 18 H, H-18), 1.80 (m, 8 H, H-3), 3.04 (dd, 4 H, H-5, ²*J* = 13.8 Hz), 3.67 (dt, 4 H, H-4, ³*J* = 6.5 Hz), 3.91 (dt, 4 H, H-4, ³*J* = 8.0 Hz), 4.34 (dd, 4 H, H-5, ²*J* = 13.4 Hz), 5.73 (s, 2 H, H-8), 6.09 (s, 2 H, H-21), 6.38 (bs, 2 H, H-15), 6.84 (s, 2 H, H-13), 7.08 (s, 2 H, H-13), 7.43 (bs, 1 H, H-23). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.09 (C-1), 14.24 (C-1), 19.22 (C-2), 19.65 (C-2), 28.58 (C-18, C-26), 32.08 (C-5), 32.47 (C-3), 32.52 (C-3), 74.69 (C-4), 74.85 (C-4), 74.93 (C-4), 79.61 (C-25), 80.23 (C-17), 115.77 (C-8), 119.56 (C-13), 124.18 (C-21), 132.03, 134.32, 134.57, 136.96, 137.02, 150.02, 153.34, 153.84, 155.00 (C_q). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₅₉H₈₅N₄O₁₀]⁺: *m/z* 1009.6260, gef.: *m/z* 1009.6301, ber. für [C₅₉H₈₄N₄NaO₁₀]⁺: *m/z* 1031.6080, gef.: *m/z* 1031.6120.

Darstellung von 5,11,17,23-Tetra-[(*N,N'*-di-*tert*-butoxycarbonyl)-guanidin]-25,26,27,28-tetra-butoxycalix[4]aren **31**



Durchführung:

0.200 g Aminocalixaren **12** (0.28 mmol, 1.00 eq.), 0.202 g AgNO₃ (1.19 mmol, 4.24 eq.), 0.325 g *N,N'*-Bis-(*tert*-butoxycarbonyl)-2-methyl-2-thiopseudoharnstoff (1.12 mmol, 4.00 eq.) und 0.170 mL Triethylamin (1.21 mmol, 4.32 eq.) werden in 25 mL DCM 48 h bei RT gerührt. Der entstehende Niederschlag wird abfiltriert, die Lösung eingeeengt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (KG 60, EA/CH = 3:1) aufgereinigt. Nach Trocknung im HV werden 0.429 g (0.26 mmol) eines orangenen Feststoffs als Produkt **31** erhalten.

Ausbeute: 91%. **Schmp.:** 395°C (Zers.). **R_f:** 0.98 (EA/CH = 3:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.98 (t, 12 H, H-1, ³J = 7.7 Hz), 1.44-1.47 (m, 80 H, H-2, H-15), 1.89 (qt, 8 H, H-3, ³J = 7.6 Hz), 3.13 (d, 4 H, H-5, ²J = 13.1 Hz), 3.84 (t, 8 H, H-4, ³J = 7.5 Hz), 4.39 (d, 4 H, H-5, ²J = 13.1 Hz), 6.90 (s, 8 H, H-8), 9.81 (s, 4 H, H-10), 11.59 (s, 4 H, H-12). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.50 (C-1), 19.44 (C-2), 28.13 (C-15), 31.46 (C-5), 32.21 (C-3), 75.17 (C-4), 79.19 (C-14), 83.11 (C-14), 123.14 (C-8), 130.79 (C-9), 134.80 (C-7), 154.06 (C-6), 163.68 (C-11), 171.24 (C-13), 171.55 (C-13). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₈₈H₁₃₃N₁₂O₂₀]⁺: *m/z* 1667.9754, gef.: *m/z* 1677.9792; ber. für [C₈₈H₁₃₂N₁₂NaO₂₀]⁺: *m/z* 1699.9573, gef.: *m/z* 1699.9569.

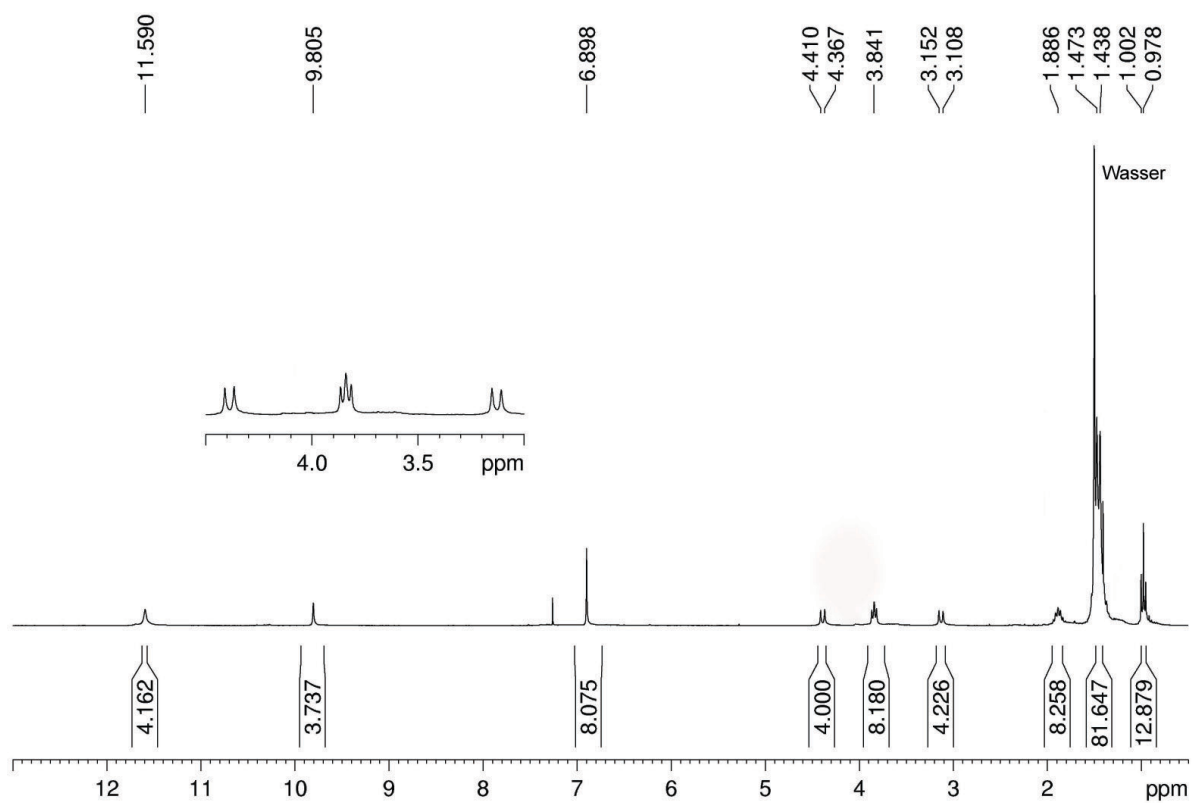
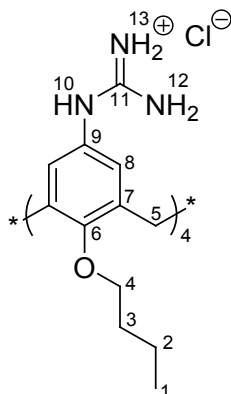


Abbildung 122: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl₃) von 31.

Darstellung von 5,11,17,23-Tetrarguanidin-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-hydrochlorid **M7**



Durchführung:

168 mg Boc-Guanidiniumcalixaren **31** (0.10 mmol, 1.0 eq.) werden in 10 mL 1,4-Dioxan gelöst, mit 5 mL konz. HCl tropfenweise versetzt und für 24 h bei RT gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird das Rohprodukt in 1 mL Methanol aufgenommen und mit Ethylacetat versetzt. Das Lösungsmittel wird eingeeengt und das Produkt im HV getrocknet. Es werden 102 mg (0.1 mmol) **M7** als heller Feststoff erhalten.

Ausbeute: 93%. **Schmp.:** >300°C. **¹H-NMR** (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 1.05 (t, 12 H, H-1, $^3J = 7.4$ Hz), 1.52 (sext, 8 H, H-2, $^3J = 7.6$ Hz), 1.98 (qt, 8 H, H-3, $^3J = 7.5$ Hz), 3.31 (m, 4 H, H-5), 3.99 (t, 8 H, H-4, $^3J = 7.4$ Hz), 4.52 (d, 4 H, H-5, $^2J = 13.2$ Hz), 6.69 (s, 8 H, H-8). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 14.62 (C-1), 20.64 (C-2), 31.79 (C-5), 33.65 (C-3), 76.69 (C-4), 126.66 (C-8), 129.98, 137.76 (C-7, C-9), 157.21, 157.93 (C-6, C-11). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₄₈H₆₉N₁₂O₄]⁺: *m/z* 877.5559, gef.: *m/z* 877.5570.

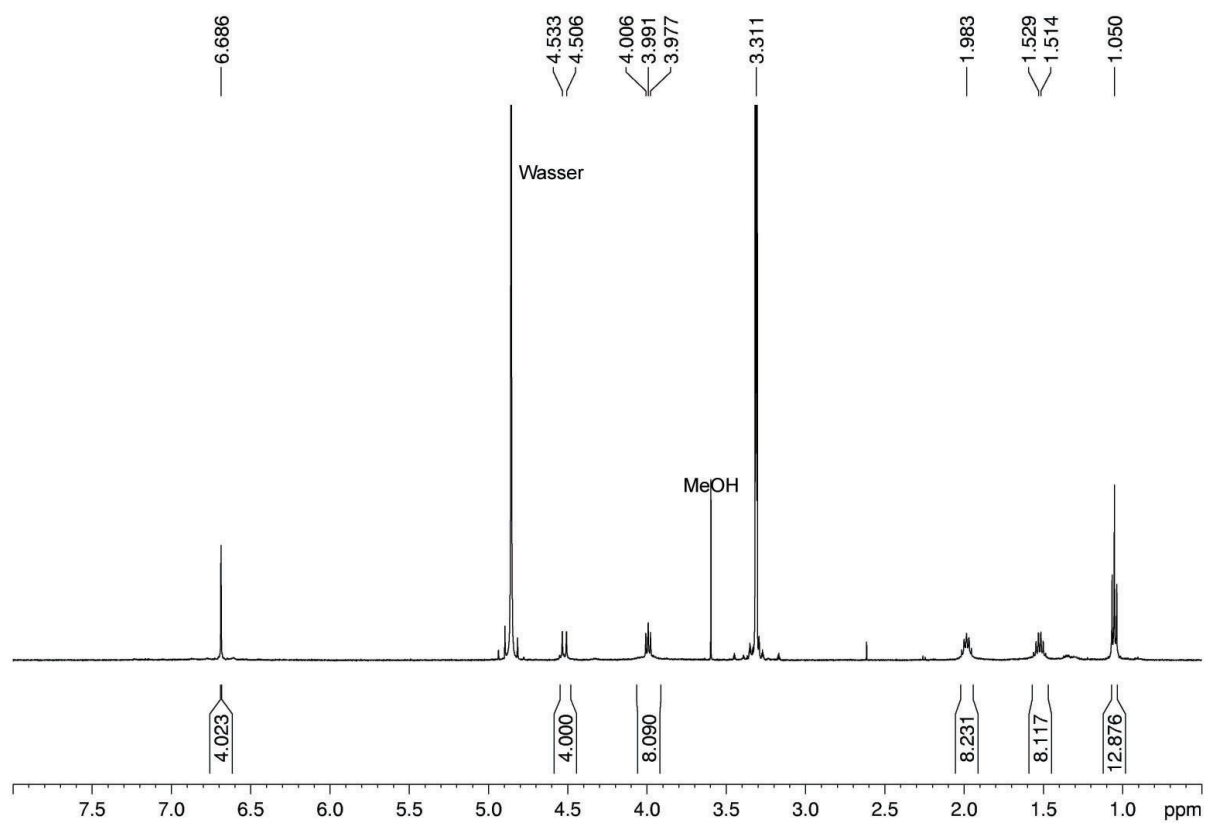
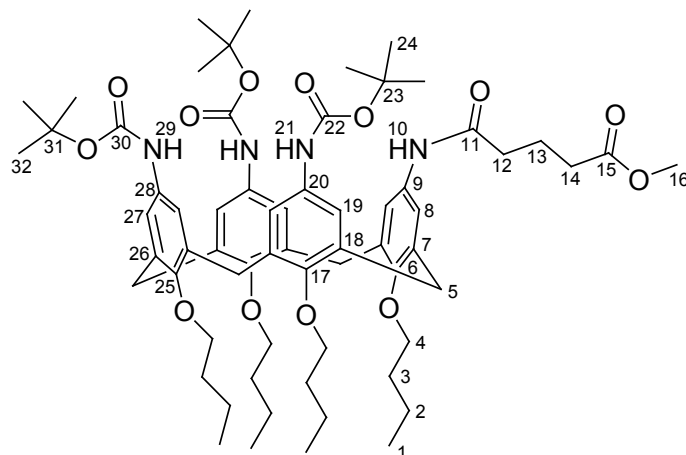


Abbildung 123: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, MeOH-d_4) von **M7**.

Darstellung von 5-Oxopentansäuremethylester-[5,11,17-Tris[(*tert*.-butoxycarbonyl)-amino]-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid] 60



Durchführung:

500 mg Boc-Aminocalixaren **13** (0.495 mmol, 1.0 eq.) werden in 40 mL abs. DCM/DMF 3:1 gelöst, mit 68 μ L Glutarsäuremonomethylesterchlorid **45** (0.495 mmol, 1.0 eq.), 164 μ L DIEA (0.990 mmol, 2.0 eq.) und einer katalytischen Menge DMAP versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit Wasser gewaschen (3x 25 mL) und die organische Phase getrocknet (Na_2SO_4), filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, CH/EA = 2:1) gereinigt und im HV getrocknet. Es werden 495 mg (0.435 mmol) **60** als hellgelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 88%. **Schmp.:** 216-222°C. **R_f:** 0.29 (CH/EA = 2:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.96 (m, 12 H, H-1), 1.31 (sext, 4 H, H-2, $^3J = 7.6$ Hz), 1.44 (s, 9 H, H-32), 1.50 (m, 4 H, H-2), 1.51 (s, 18 H, H-24), 1.82 (m, 8 H, H-3), 1.98 (qt, 2 H, H-13, $^3J = 7.1$ Hz), 2.32 (t, 2 H, H-12, $^3J = 7.2$ Hz), 2.38 (t, 2 H, H-14, $^3J = 7.2$ Hz), 3.08 (d, 4 H, H-5, $^2J = 13.4$ Hz), 3.66 (s, 3 H, H-16), 3.71 (m, 4 H, H-4), 3.90 (t, 4 H, H-4, $^3J = 7.9$ Hz), 4.36 (dd, 4 H, H-5, $^2J = 13.3$ Hz, $^4J = 4.5$ Hz), 6.20 (s, 1 H, H-29), 6.28 (s, 2 H, H-27), 6.31 (s, 2 H, H-21), 6.45 (s, 2 H, H-8), 6.87 (s, 4 H, H-19), 7.03 (s, 1 H, H-10). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.12, 14.24 (C-1), 19.30, 19.60 (C-2), 20.92 (C-13), 28.58 (C-24, C-32), 31.25 (C-5), 32.08, 32.45 (C-3), 33.25 (C-14), 36.15 (C-12), 51.78 (C-16), 74.94, 74.98, 75.01 (C-4), 80.14, 80.22 (C-23, C-31), 119.84 (C-27), 119.93 (C-19), 120.69 (C-8), 131.60, 131.99 (C-9, C-28), 132.08 (C-20), 134.48, 134.57, 136.37, 136.45 (C-7, C-18, C-26), 152. (C-25), 153.20 (C-6), 153.44 (C-17), 153.52, 153.69 (C-22, C-30), 170.29 (C-11),

173.95 (C-15). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für $[\text{C}_{65}\text{H}_{92}\text{N}_4\text{NaO}_{13}]^+$: m/z 1159.6553, gef.: m/z 1159.6642, $[\text{C}_{130}\text{H}_{184}\text{N}_8\text{NaO}_{26}]^+$: m/z 2297.3247, gef.: m/z 2297.3420.

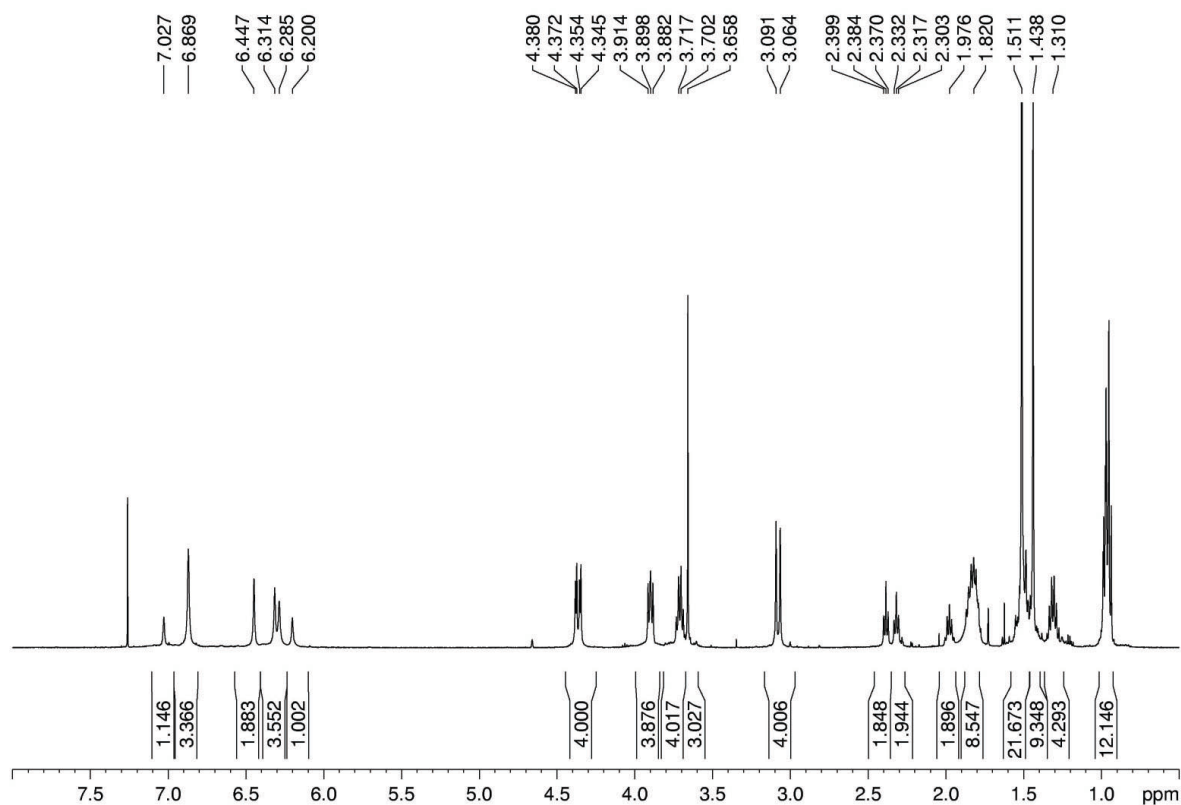
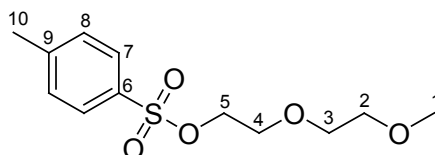


Abbildung 124: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl₃) von **60**.

5.3.2 Synthese der wasserlöslichen Calix[4]arene

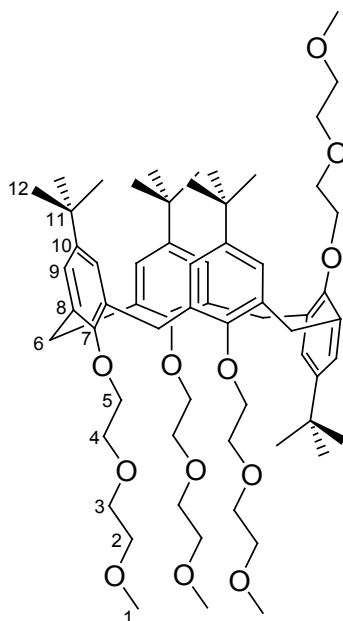
Darstellung von 3,6-Dioxaheptyl-4-toluolsulfonat **34**^[180]



Durchführung:

9.0 g Diethylenglycolmonomethylether (75 mmol, 1.00 eq.) werden in 75 mL DCM gelöst und mit 0.69 g Benzyltriethylammoniumchlorid (3 mmol, 0.04 eq.) und 60 mL 30%iger wässriger NaOH-Lösung versetzt. 15.20 g *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (80 mmol, 1.1 eq.), gelöst in 75 mL DCM, werden hinzu getropft und die Reaktionsmischung 20 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 100 mL Wasser wird die organische Phase abgetrennt und mit Wasser gewaschen (3x 75 mL). Die organische Phase wird getrocknet (Na₂SO₄), filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, DCM) gereinigt und im HV getrocknet. Es werden 18.10 g (66 mmol) des Produkts **34** als klares Öl erhalten.

Ausbeute: 88%. **R_f:** 0.1 (DCM). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.41 (s, 3 H, H-10), 3.08 (s, 3 H, H-1), 3.44 (m, 2 H, H-2), 3.53 (m, 2 H, H-3), 3.65 (m, 2 H, H-4), 4.13 (m, 2 H, H-5), 7.31 (dd, 2 H, H-8, ⁴*J* = 0.7 Hz, ³*J* = 8.6 Hz), 7.76 (d, 2 H, H-7, ³*J* = 8.3 Hz). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 21.63 (C-10), 59.03 (C-1), 68.70, 69.27, 70.66, 71.82 (C-2, C-3, C-4, C-5), 127.98 (C-7), 129.85 (C-8), 133.00 (C-9), 144.85 (C-6). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₂H₁₈NaO₅S]⁺: *m/z* 297.0767, gef.: *m/z* 297.0780.

Darstellung von 5,11,17,23-Tetra-*tert*.-Butyl-25,26,27,28-tetra-3,6-dioxaheptyloxy-calix[4]aren 33**Durchführung:**

0.64 g Calixaren **9** (1.0 mmol, 1.0 eq.) werden in 50 mL abs. THF/abs. DMF 4:1 suspendiert, mit 1.12 g Kalium-*tert*.-butanolat (10.0 mmol, 10.0 eq.) versetzt und auf 70°C erhitzt. 2.80 g 3,6-Dioxaheptyl-4-toluolsulfonat **34** (10.0 mmol, 10.0 eq.), gelöst in 10 mL abs. THF werden über 20 min zugetropft und die Reaktionsmischung 48 h bei 70°C gerührt. Nach Zugabe von 100 mL Wasser wird die wässrige Phase mit DCM (2x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser (3x 60 mL) gewaschen, getrocknet (Na₂SO₄), filtriert und eingengt. Der ölige Rückstand wird mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (KG 60, CH/EA = 3:1) aufgereinigt und im HV getrocknet. Es werden 0.65 g (0.60 mmol) des Produkts **33** als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 60%. **Schmp.:** 75°C. **R_f:** 0.5 (CH/EA = 3:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.02 (s, 18 H, H-12), 1.34 (s, 9 H, H-12), 1.41 (s, 9 H, H-12), 3.02 (d, 2 H, H-6, ²J = 12.9 Hz), 3.31 (s, 3 H, H-1), 3.38 (s, 6 H, H-1), 3.39 (s, 3 H, H-1), 3.48-3.96 (m, 36 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.13 (d, 2 H, H-6, ²J = 12.7 Hz), 6.52 (d, 2 H, H-9, ⁴J = 2.5 Hz), 6.88 (d, 2 H, H-9, ⁴J = 2.5 Hz), 7.06 (s, 2 H, H-9), 7.26 (s, 2 H, H-9). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 31.22 (C-6), 31.58, 31.85, 31.93 (C-12), 33.85, 34.22 (C-11), 59.06, 59.22, 59.26 (C-1), 69.78, 70.03, 70.35, 70.39, 70.44, 70.51, 70.55, 72.10, 72.16, 72.27, 72.53 (C-2, C-3, C-4, C-5), 125.49, 125.51, 126.03, 127.87 (C-9), 132.07, 132.27, 133.05, 135.75 (C-8),

143.37, 143.87, 145.21 (C-10), 153.26, 153.95, 154.95 (C-7). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für $[\text{C}_{64}\text{H}_{96}\text{NaO}_{12}]^+$: m/z 1079.6794, gef.: m/z 1079.6796.

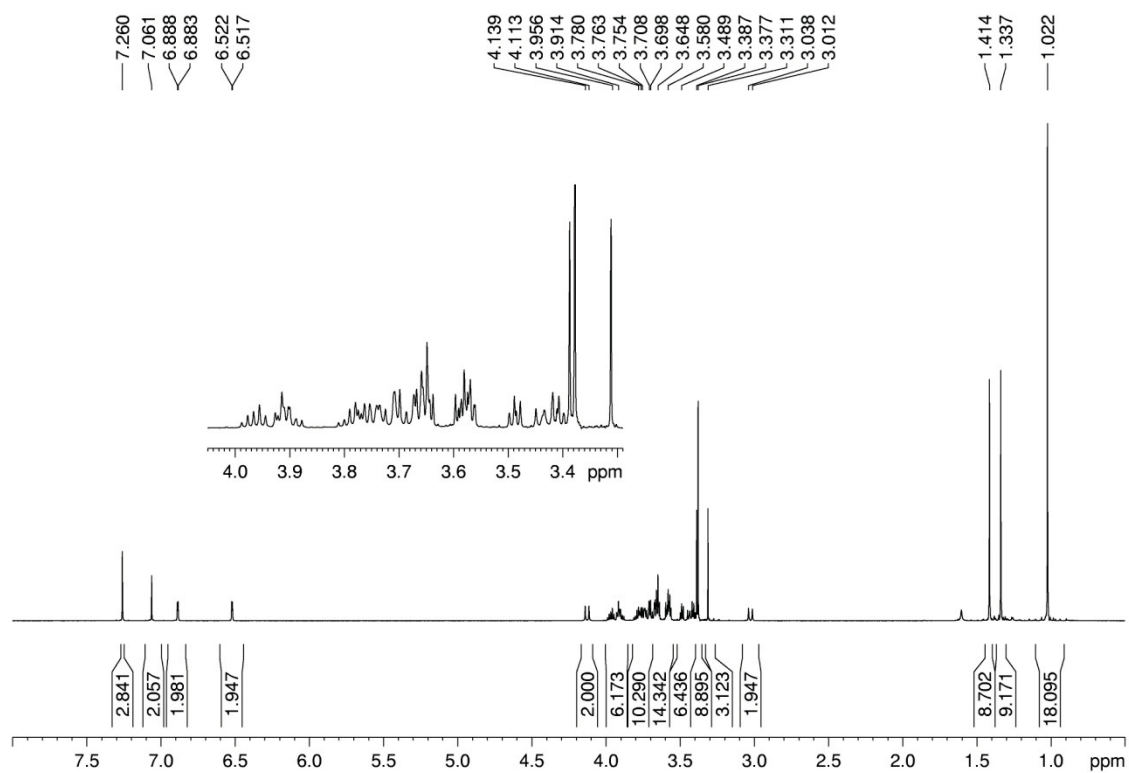
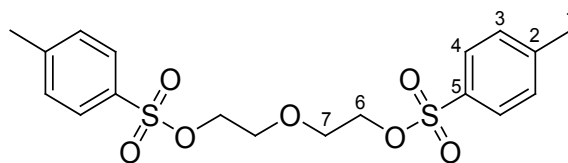


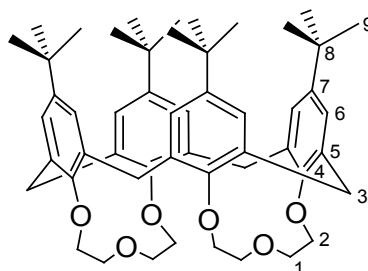
Abbildung 125: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl_3) von **33**.

Darstellung von 2,2'-Oxybis(ethan-2,1-diyl)bis(4-toluolsulfonat) **35^[184]****Durchführung:**

Unter Eiskühlung werden 21.0 g NaOH (0.53 mol, 3.5 eq.) in 100 mL Wasser gelöst. Zu einer Lösung von 14.3 mL Diethylenglycol (0.15 mol, 1.0 eq.) in 100 mL THF wird eine Lösung von 21.0 g NaOH (0.53 mol, 3.5 eq.) in 100 mL Wasser gegeben und auf 0°C gekühlt. Bei 0°C werden 62.9 g *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (0.33 mol, 2.2 eq.), gelöst in 150 mL THF, über 2 h zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 2 h bei 0°C gerührt und in eine 10%ige wässr. HCl-Lösung (0°C) gegeben. Der ausgefallene Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser und NaHCO₃-Lösung gewaschen und aus MeOH umkristallisiert. Nach Trocknung im HV werden 53.5 g (0.13 mol) **35** in Form von weißen Kristallen erhalten.

Ausbeute: 86%. **Schmp.:** 88-90°C. **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.41 (s, 6 H, H-1), 3.61 (m, 4 H, H-7), 4.09 (m, 4 H, H-6), 7.34 (d, 4 H, H-3, $^3J = 8.0$ Hz), 7.78 (d, 4 H, H-4, $^3J = 8.3$ Hz). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 21.79 (C-1), 68.91, 69.12 (C-6, C-7), 128.09 (C-4), 130.04 (C-3), 133.02 (C-2), 145.09 (C-5). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₈H₂₂NaO₇S₂]⁺: m/z 437.0699, gef.: m/z 437.0741.

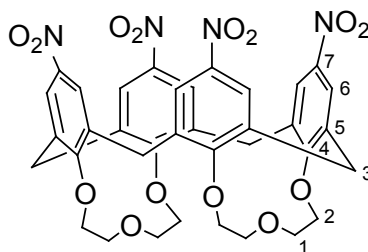
Darstellung von 5,11,17,23-Tetra-*tert*-Butyl-25,26,27,28-biskrone-3-calix[4]aren **36**^[185]



Durchführung:

0.51 g 60% NaH in Öldispersion (12.5 mmol, 5.0 eq.) werden mit abs. *n*-Hexan (3x 20 mL) gewaschen, mit 250 mL abs. DMF und 1.62 g Calixaren **9** (2.5 mmol, 1.0 eq.) versetzt und 30 min bei 50°C gerührt. 2.59 g Ditosylat **35** (6.25 mmol, 2.5 eq.), gelöst in 25 mL abs. DMF, werden langsam hinzu getropft und die Mischung 24 h bei 50°C gerührt. Die Reaktionsmischung wird abgekühlt, mit einer kleinen Menge MeOH versetzt und das DMF abkondensiert. Das hellgelbe Rohprodukt wird mit 150 mL 10% HCl aufgenommen und mit 150 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser (3x 150 mL) gewaschen, getrocknet (Na₂SO₄), filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wird mit Acetonitril versetzt, der entstehende Niederschlag abfiltriert und säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt. Nach Trocknung im HV werden 0.92 g (1.17 mmol) eines weißen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 47%. **Schmp.:** 274°C. **R_f:** 0.8 (CH/Ea = 7:2). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.11 (s, 36 H, H-9), 3.14 (d, 2 H, H-3, ²*J* = 12.2 Hz), 3.18 (d, 2 H, H-3, ²*J* = 12.4 Hz), 3.94 (t, 4 H, H-2, ³*J* = 9.8 Hz), 4.20 (m, 8 H, H-1), 4.33 (d, 4 H, H-2, ³*J* = 10.9 Hz), 4.47 (d, 2 H, H-3, ²*J* = 12.3 Hz), 5.05 (d, 2 H, H-3, ²*J* = 12.1 Hz), 6.90 (d, 4 H, H-6, ⁴*J* = 2.3 Hz), 6.95 (d, 4 H, H-6, ⁴*J* = 2.3 Hz). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 30.18, 31.26 (C-3), 31.53 (C-9), 34.03 (C-8), 74.27 (C-1), 75.90 (C-2), 124.69, 125.68 (C-6), 134.38, 134.91 (C-5), 145.15 (C-7), 152.87 (C-4). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₅₂H₆₈NaO₆]⁺: *m/z* 811.4908, gef.: *m/z* 811.4958.7.

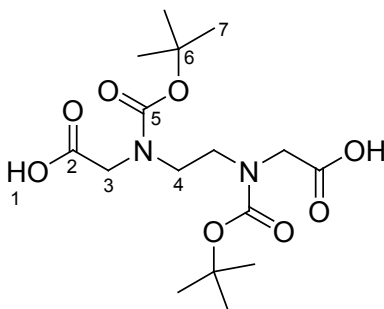
Darstellung von 5,11,17,23-Tetranitro-25,26,27,28-biskrone-3-calix[4]aren **37^[203]****Durchführung:**

470 mg Kronencalixaren **36** (0.60 mmol, 1.0 eq.) werden in 12 mL HOAc suspendiert, auf 100°C erhitzt, mit 1.4 mL konz Salpetersäure versetzt und 20 min bei 100°C gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und mit HOAc (2x 2.5 mL) und MeOH (2x 2.5 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wird mit heißem Toluol versetzt, eingengt und im HV (Wasserbad 60°C) getrocknet. Es werden 163 mg (0.22 mmol) eines hellgelben Feststoffes erhalten.

Ausbeute: 37%. **Schmp.:** 279°C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.75 (m, 6 H, H-2, H-3), 3.80 (d, 2 H, H-3, $^2J = 12.3$ Hz), 4.20-4.23 (m, 8 H, H-1), 4.39 (d, 2 H, H-2, $^3J = 10.5$ Hz), 4.51 (d, 2 H, H-3, $^2J = 12.2$ Hz), 5.06 (d, 2 H, H-3, $^2J = 11.9$ Hz), 8.31 (s, 4 H, H-6), 8.33 (s, 4 H, H-6). **¹³C-NMR** (125.7 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 28.28, 28.69 (C-3), 73.64 (C-1), 77.15 (C-2), 124.18, 125.00 (C-6), 136.63 (C-5), 143.49 (C-7), 161.15 (C-4). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₃₆H₃₂N₄NaO₁₄]⁺: m/z 767.1807, gef.: m/z 767.1843, [C₇₂H₆₄N₈NaO₂₈]⁺: m/z 1511.3728, gef.: m/z 1511.3796.

5.3.3 Synthese der Diaminosäurespacer 25 und 26

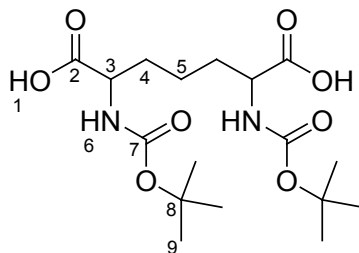
Darstellung von Ethylen-bis[(*tert.*-butoxycarbonyl)-amino-*N,N'*-diessigsäure 25



Durchführung:

150 mg Ethylendiamin-*N,N'*-diessigsäure **23** (0.85 mmol, 1.0 eq.) werden in einer Mischung aus 10 mL 1,4-Dioxan, 5 mL Wasser und 5 mL 1 M NaOH gelöst und 10 min bei 0°C gerührt. 410 mg Di-*tert.*-butyldicarbonat (1.87 mmol, 2.2 eq.) werden hinzugefügt und die Reaktionslösung 20 h bei RT gerührt. Die Lösung wird unter Vakuum auf 1/3 des Volumens eingengt, im Eisbad gekühlt und mit einer Ethylacetatschicht bedeckt (ca. 10 mL). Die beiden Phasen werden gut gerührt und mit einer verdünnten KHSO₄-Lösung auf pH = 3 angesäuert. Die wässrige Phase wird schnell von der organischen getrennt und mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden vereinigt, mit Wasser (20 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels werden 126 mg (0.33 mmol) des Produkts **25** als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 40%. **Schmp.:** 169°C. **¹H-NMR** (300 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 1.47 (s, 18 H, H-7), 3.43 (m, 4 H, H-4), 3.97 (s, 4 H, H-3), 4.97 (bs, 2 H, H-1). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₆H₂₇N₂O₈]⁺: *m/z* 375.1773, gef.: *m/z* 375.1742, ber. für [C₁₆H₂₆N₂NaO₈]⁺: *m/z* 397.1592, gef.: *m/z* 397.1563.

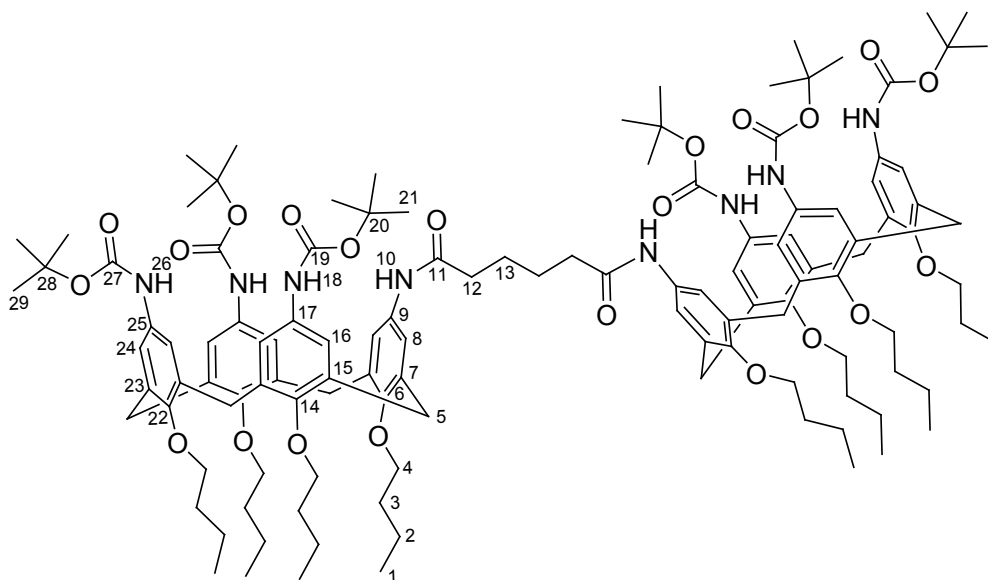
Darstellung von 2,6-Bis-[(*tert.*-butoxycarbonyl)-amino]-pimelinsäure 26**Durchführung:**

380 mg 2,6-Diaminopimelinsäure **24** (2.0 mmol, 1.0 eq.) werden in einer Mischung aus 10 mL 1,4-Dioxan, 5 mL Wasser und 5 mL 1 N NaOH gelöst und 10 min bei 0°C gerührt. 980 mg Di-*tert.*-butyldicarbonat (4.5 mmol, 2.3 eq.) werden hinzugefügt und die Reaktionslösung 20 h bei RT gerührt. Die Lösung wird unter Vakuum auf 1/3 des Volumens eingengt, im Eisbad gekühlt und mit einer Ethylacetatschicht bedeckt (ca. 10 mL). Die beiden Phasen werden gut gerührt und mit einer verdünnten KHSO₄-Lösung auf pH = 3 angesäuert. Die wässrige Phase wird schnell von der organischen getrennt und mit Ethylacetat (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden vereinigt, mit Wasser (20 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels werden 413 mg (1.06 mmol) eines weißen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 53%. **Schmp.:** 65-67°C. **¹H-NMR** (300 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 1.44 (s, 18 H, H-9), 1.46 (m, 2 H, H-5), 1.66 (m, 2 H, H-4), 1.82 (m, 2 H, H-4), 4.07 (m, 2 H, H-3), 5.01 (bs, 2 H, H-1). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₇H₃₀N₂NaO₈]⁺: m/z 413.1894, gef.: m/z 413.1942, ber. für [C₃₄H₆₀N₄NaO₁₆]⁺: m/z 803.3897, gef.: m/z 803.3985, ber. für [C₅₁H₉₀N₆NaO₂₄]⁺: m/z 1193.5899, gef.: m/z 1193.6029. (ESI-neg., MeOH): ber. für [C₁₇H₂₉N₂O₈]⁻: m/z 389.1929, gef.: m/z 389.1929, ber. für [C₃₄H₅₉N₄O₁₆]⁻: m/z 779.3932, gef.: m/z 779.3944.

5.3.4 Synthese der Boc-geschützten Anilincalix[4]aren-Dimere

Darstellung von Adipinsäure-bis-[5,11,17-tris-[(*tert.*-butoxycarbonyl)-amino]-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid] **18**^[112, 204]



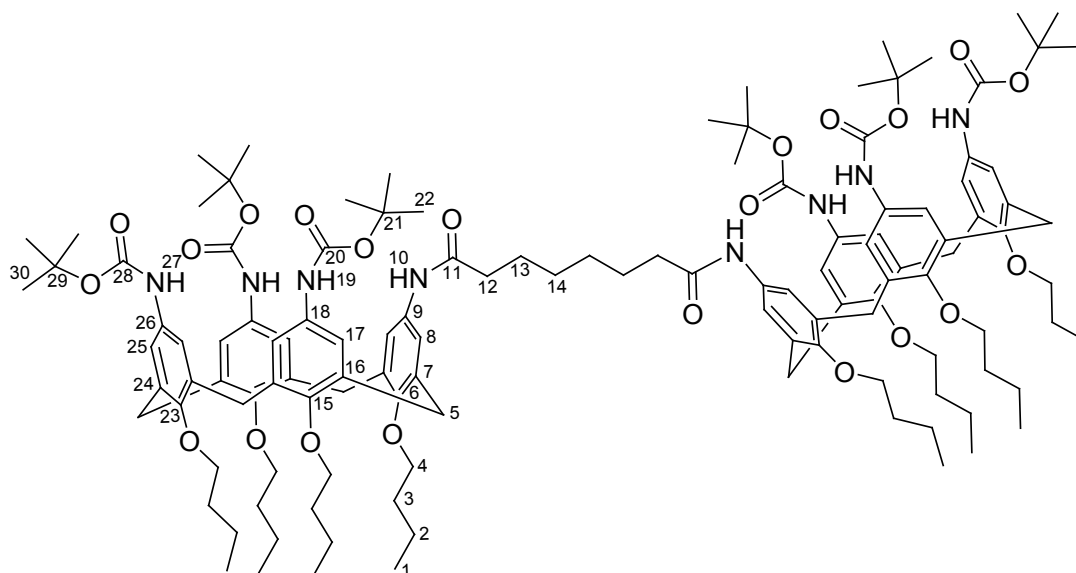
Durchführung:

150 mg Calixaren **13** (0.15 mmol, 2.0 eq.) werden in 45 mL abs. DCM gelöst und mit 38 μ L DIEA (0.23 mmol, 3.1 eq.) und einer katalytischen Menge DMAP versetzt. 11 μ L Adipinsäuredichlorid **14** (0.074 mmol, 1.0 eq.), gelöst in 2 mL abs. DCM, werden langsam zugetropft und die Reaktionsmischung 24 h bei RT gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, EA/CH = 2:1) gereinigt und der isolierte Feststoff im HV getrocknet. Es werden 145 mg (0.068 mmol) des Produkts **18** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 95%. **Smp.:** 192-194°C. **R_f:** 0.88 (EA/CH = 2:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.96 (m, 24 H, H-1), 1.29 (m, 16 H, H-2), 1.44 (s, 18 H, H-29), 1.50 (s, 36 H, H-21), 1.80 (m, 20 H, H-3, H-13), 2.28 (t, 4 H, H-12, ³J = 7.0 Hz), 3.01 (d, 4 H, H-5, ²J = 13.5 Hz), 3.07 (d, 4 H, H-5, ²J = 13.5 Hz), 3.71 (t, 8 H, H-4, ³J = 7.5 Hz), 3.86 (t, 8 H, H-4, ³J = 7.5 Hz), 4.30 (d, 8 H, H-5, ²J = 13.5 Hz), 6.31 (s, 4 H, H-8), 6.41 (bs, 6 H, H-24, H-26), 6.47 (bs, 4 H, H-18), 6.76 (s, 4 H, H-16), 6.80 (s, 4 H, H-16), 7.33 (bs, 2 H, H-10). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.08, 14.18 (C-1), 19.29, 19.54 (C-2), 25.10, (C-13), 28.58 (C-21, C-29), 31.19 (C-5), 32.08, 32.38 (C-3), 36.92 (C-12), 74.88 (C-4), 80.07,

80.17 (C-20, C-28), 119.91 (C-16), 120.01 (C-8), 120.88 (C-24), 131.77, 132.00, 132.06 (C-9, C-17, C-25), 134.57, 136.06 (C-7, C-15, C-23), 152.56, 153.14 (C-6, C-14, C-22), 153.33, 153.58 (C-19, C-27), 153.83 (C-6, C-14, C-22), 171.36 (C-11). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für $[\text{C}_{124}\text{H}_{174}\text{N}_8\text{NaO}_{22}]^+$: m/z 2151.2668, gef.: m/z 2151.2741, ber. für $[\text{C}_{124}\text{H}_{174}\text{N}_8\text{Na}_2\text{O}_{22}]^{2+}$: m/z 1087.1280, gef.: m/z 1087.1306.

Darstellung von Octandisäure-bis-[5,11,17-tris-[(*tert.*-butoxycarbonyl)-amino]-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid] 19



Durchführung:

150 mg Calixaren **13** (0.150 mmol, 2.0 eq.) werden in 40 mL abs. DCM gelöst und mit 38 μL DIEA (0.223 mmol, 3.0 eq.) und einer katalytischen Menge DMAP versetzt. Zur Reaktionslösung werden 13 μL Octandisäuredichlorid **15** (0.074 mmol, 1.0 eq.), gelöst in 3 mL abs. DCM, langsam zugetropft und die Reaktionsmischung 24 h bei RT gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, EA/CH = 1:2) gereinigt. Es werden 130 mg (0.060 mmol) des Produkts **19** in Form eines hellbraunen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 81%. **Schmp.:** 151-153°C. **R_f:** 0.37 (EA/CH = 1:2). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.96 (m, 24 H, H-1), 1.32 (m, 16 H, H-2), 1.44 (s, 18 H, H-30), 1.51 (s, 36 H, H-22), 1.64 (bs, 4 H, H-14), 1.73 (bs, 4 H, H-13), 1.82 (m, 16 H, H-3), 2.25 (t, 4 H, H-12, $^3J = 7.0$ Hz), 3.05 (dd, 8 H, H-5, $^2J = 13.5$ Hz), 3.71 (m, 8 H, H-4), 3.88 (t, 8 H, H-4, $^3J = 7.5$ Hz), 4.35 (d, 8 H, H-5, $^2J = 13.5$ Hz), 6.16 (s, 2 H, H-27), 6.29 (s, 4 H, H-8), 6.41 (s, 4 H, H-19), 6.47 (s, 4 H, H-25), 6.83 (s, 8 H, H-17), 7.05 (s, 2 H, H-10). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.13, 14.24 (C-1), 19.31, 19.60 (C-2), 25.59 (C-13), 28.61 (C-22, C-30), 29.84 (C-14), 31.25 (C-5), 32.10, 32.44 (C-3), 36.9 (C-12), 74.93, 74.97 (C-4), 80.17 (C-21, C-29), 119.80, 119.90 (C-17), 120.01 (C-8), 120.91 (C-25), 131.68, 131.96, 132.14 (C-9, C-18, C-26), 134.58, 136.26, 136.31 (C-7, C-16, C-24), 152.62, 153.24 (C-6, C-15, C-23), 153.43, 153.49 (C-20, C-28), 153.74 (C-6, C-15, C-23), 171.51 (C-11). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₂₆H₁₇₈N₈NaO₂₂]⁺: m/z 2179.2981, gefunden: m/z 2179.3002.

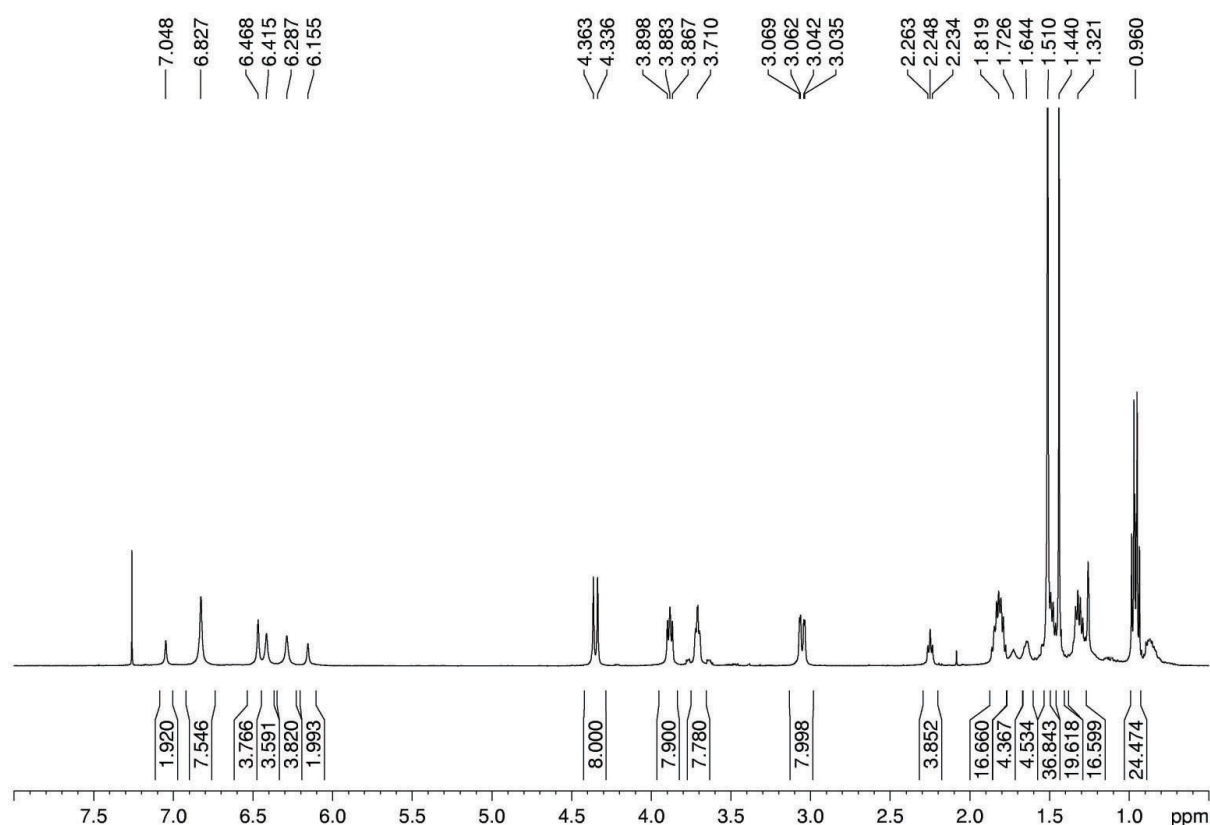
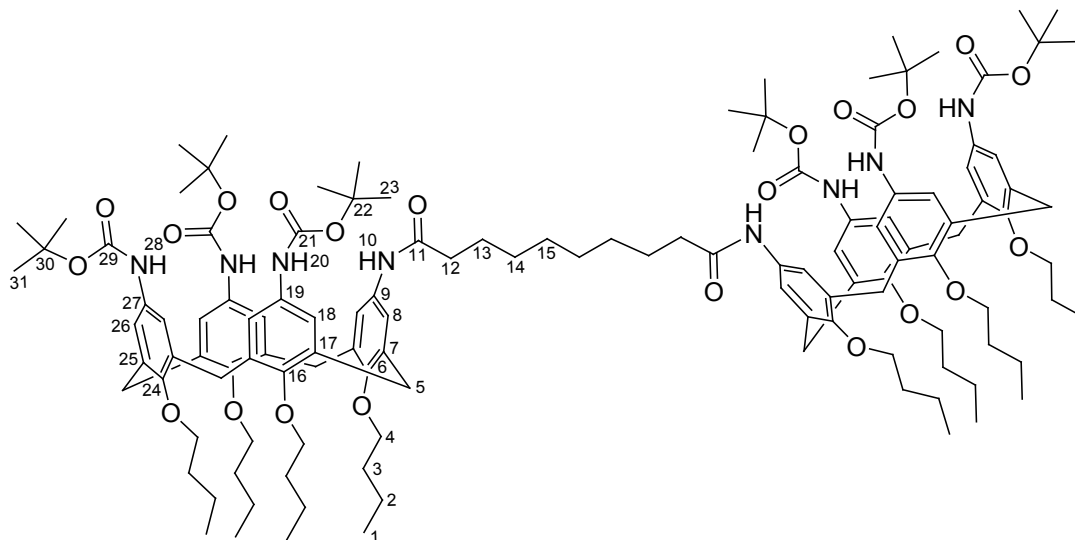


Abbildung 126: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl₃) von 19.

Darstellung von Sebacinsäure-bis-[5,11,17-tris-[(*tert.*-butoxycarbonyl)-amino]-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid] 20**Durchführung:**

150 mg Calixarenamin **13** (0.150 mmol, 2.0 eq.) werden in 40 mL abs. DCM gelöst und mit 38 μ L DIEA (0.223 mmol, 3.0 eq.) und einer katalytischen Menge DMAP versetzt. Zur Reaktionslösung werden 16 μ L Sebacinsäuredichlorid **16** (0.074 mmol, 1.0 eq.), gelöst in 3 mL abs. DCM, langsam zugetropft und die Mischung 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, EA/CH = 1:2) gereinigt. Es werden 122 mg (0.056 mmol) des Produkts **20** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 74%. **Schmp.:** 158-162°C. **R_f:** 0.53 (EA/CH = 1:2). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.96 (m, 24 H, H-1), 1.29 (m, 16 H, H-2), 1.44 (s, 18 H, H-31), 1.48 (m, 8 H, H-14, H-15), 1.51 (s, 36 H, H-23), 1.63 (m, 4 H, H-13), 1.82 (m, 16 H, H-3), 2.24 (t, 4 H, H-12, ³J = 7.0 Hz), 3.06 (dd, 8 H, H-5, ²J = 13.5 Hz), 3.71 (dt, 8 H, H-4), 3.88 (t, 8 H, H-4, ³J = 7.5 Hz), 4.35 (d, 8 H, H-5, ²J = 13.3 Hz), 6.11 (s, 2 H, H-28), 6.30 (s, 4 H, H-8), 6.38 (s, 4 H, H-20), 6.49 (s, 4 H, H-26), 6.83 (s, 8 H, H-18), 7.00 (s, 2 H, H-10). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.12, 14.23, 14.25 (C-1), 19.31, 19.59 (C-2), 25.69 (C-13), 28.64 (C-23, C-31), 29.49 (C-14, C-15), 31.25 (C-5), 32.06, 32.10, 32.43 (C-3), 37.57 (C-12), 74.93 (C-4), 80.19 (C-22, C-30), 119.79, 119.88 (C-18), 120.06 (C-8), 120.56 (C-26), 131.79, 131.92, 132.11 (C-9, C-19, C-27), 134.59, 136.24, 136.31 (C-7, C-17, C-25), 152.64, 153.15 (C-6, C-16, C-24), 153.43, 153.48 (C-21, C-29), 153.70 (C-6, C-16, C-24), 171.41 (C-11).

HRMS (ESI-pos., MeOH): ber. für $[\text{C}_{128}\text{H}_{182}\text{N}_8\text{NaO}_{22}]^+$: m/z 2207.3294, gef.: m/z 2207.3245,
ber. für $[\text{C}_{128}\text{H}_{182}\text{N}_8\text{Na}_2\text{O}_{22}]^{2+}$: m/z 1115.1593, gef.: m/z 1115.1586.

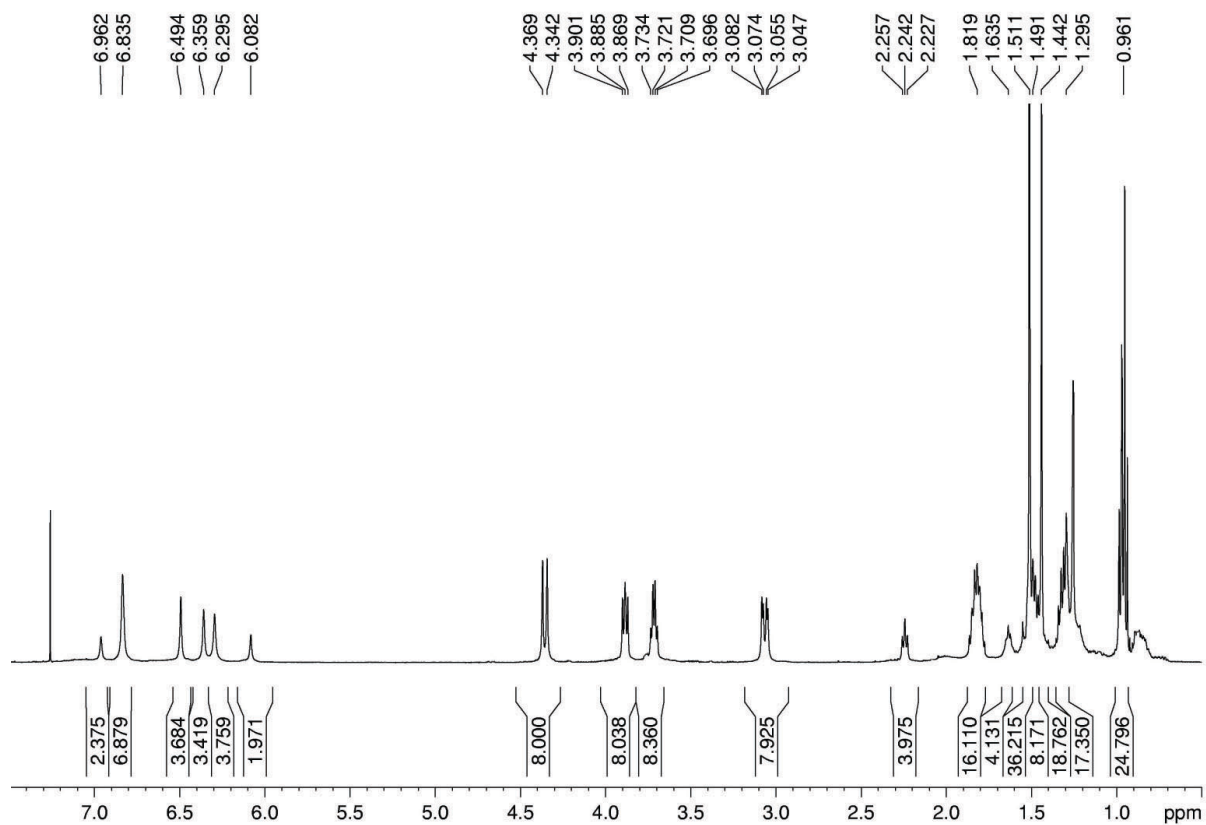
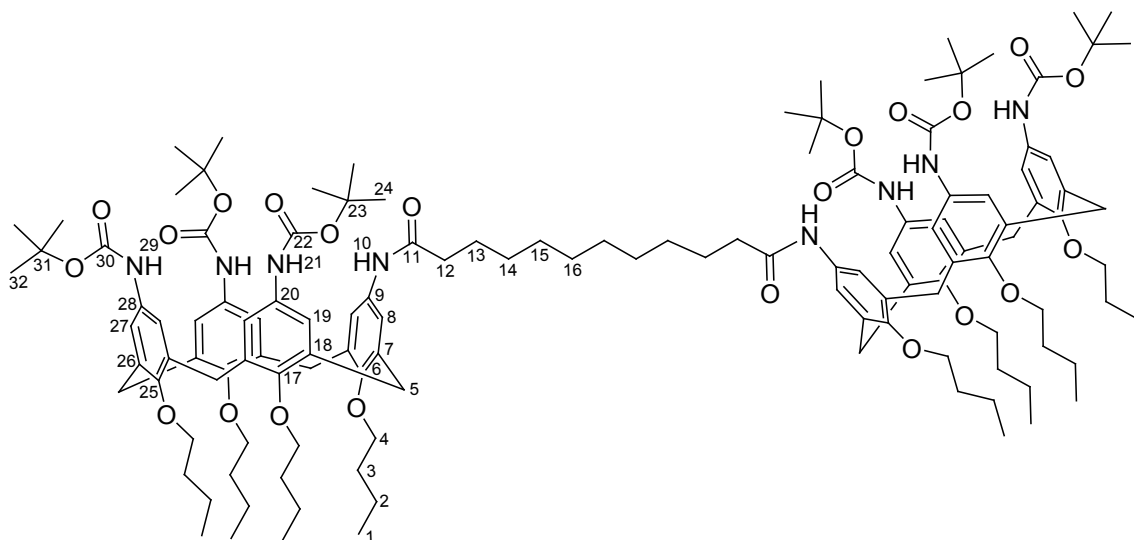


Abbildung 127: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl₃) von **20**.

Darstellung von Dodecandisäure-bis-[5,11,17-tris-[(*tert.*-butoxycarbonyl)-amino]-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid] 21

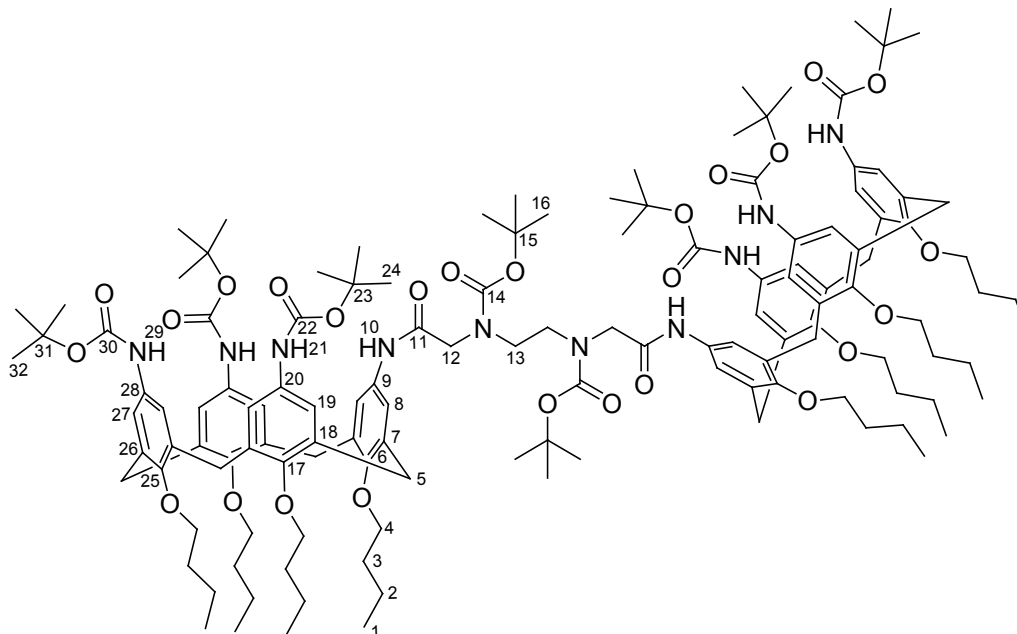


Durchführung:

150 mg Calixaren **13** (0.15 mmol, 2.0 eq.) werden in 45 mL abs. DCM gelöst und mit 38 μ L DIEA (0.230 mmol, 3.1 eq.) und einer katalytischen Menge DMAP versetzt. 19 μ L Dodecandisäuredichlorid **17** (0.074 mmol, 1.0 eq.), gelöst in 2 mL abs. DCM, werden langsam zutropft und die Reaktionsmischung 24 h bei RT gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, EA/CH = 1:2) gereinigt und 123 mg (0.056 mmol) des Produkts **21** in Form eines hellbraunen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 74%. **Smp.:** 126°C. **R_f:** 0.57 (EA/CH = 1:2). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.96 (m, 24 H, H-1), 1.30 (m, 16 H, H-2), 1.44 (s, 18 H, H-32), 1.51 (s, 36 H, H-24), 1.48 (m, 12 H, H-14, H-15, H-16), 1.63 (bs, 4 H, H-13), 1.82 (m, 16 H, H-3), 2.24 (t, 4 H, H-12, ³*J* = 7.7 Hz), 3.05 (d, 4 H, H-5, ²*J* = 13.4 Hz), 3.08 (d, 4 H, H-5, ²*J* = 13.5 Hz), 3.71 (m, 8 H, H-4), 3.89 (t, 8 H, H-4, ³*J* = 7.8 Hz), 4.36 (d, 8 H, H-5, ³*J* = 13.2 Hz), 6.16 (s, 2 H, H-29), 6.30 (s, 4 H, H-8), 6.42 (s, 4 H, H-20), 6.50 (s, 4 H, H-27), 6.84 (s, 8 H, H-19), 7.06 (s, 2 H, H-10). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.08, 14.19, 14.21 (C-1), 19.28, 19.56 (C-2), 25.73 (C-13), 28.57 (C-24, C-32), 29.38, 29.41, 29.46 (C-14, C-15, C-16), 31.21, 32.03 (C-5), 32.07, 32.40 (C-3), 37.58 (C-12), 74.89, 74.96 (C-4), 80.06, 80.13 (C-23, C-31), 119.79, 119.89 (C-19), 120.01 (C-8), 120.45 (C-27), 131.84, 131.93, 132.09 (C-9, C-20, C-28), 134.53, 136.20, 136.26 (C-7, C-18, C-26), 152.58, 153.04 (C-6, C-17, C-25), 153.40, 153.48 (C-22, C-30), 153.70 (C-6, C-17, C-25), 171.45 (C-11). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₃₀H₁₈₆N₈NaO₂₂]⁺: *m/z* 2235.3607, gef.: *m/z* 2235.3608.

Darstellung von Ethylen-bis-[(*tert.*-butoxycarbonyl)-amino]-*N,N'*-diessigsäure-bis-[5,11,17-tris-[(*tert.*-butoxycarbonyl)-amino]-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid] **27**



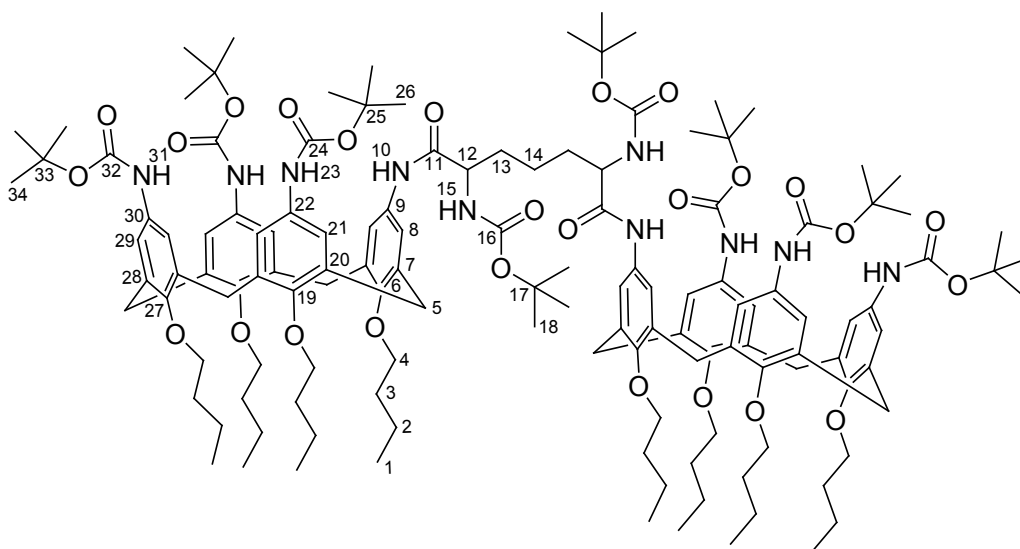
Durchführung:

28 mg Disäure **25** (0.074 mmol, 1.0 eq.) werden in 40 mL abs. DCM/DMF (3:1) gelöst. 63 mg Cl-HOBt (0.370 mmol, 5.0 eq.), 62 mg HCTU (0.150 mmol, 2.0 eq.) und 74 μ L DIEA (0.450 mmol, 6.0 eq.) werden hinzugegeben und die Mischung 10 min bei 0°C gerührt. 150 mg Calixaren **13** (0.150 mmol, 2.0 eq.), gelöst in 4 mL abs. DCM/DMF (3:1), werden zur Reaktionsmischung hinzu getropft. Die Lösung wird 24 h bei RT gerührt, mit Wasser (3x 30 mL) gewaschen, getrocknet (Na_2SO_4), filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (KG 60, EA/CH = 1:2) gereinigt und 134 mg (0.057 mmol) des Produkts **27** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 77%. **Schmp.:** 186-188°C. **R_f:** 0.49 (EA/CH = 1:2). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.01 (m, 24 H, H-1), 1.29 (m, 16 H, H-2), 1.49 (m, 72 H, H-16, H-24, H-32), 1.86 (m, 16 H, H-3), 3.11 (dd, 8 H, H-5, $^2J = 13.3$ Hz), 3.51 (m, 4 H, H-13), 3.76 (m, 8 H, H-4), 3.87 (m, 8 H, H-4), 4.00 (m, 4 H, H-12), 4.40 (m, 8 H, H-5), 6.25, 6.41, 6.48, 6.58, 6.68, 6.82, 6.96 (bs, 24 H, H-8, H-10, H-19, H-21, H-27, H-29). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.14, 14.21, 14.25 (C-1), 19.37, 19.55 (C-2), 28.51, 28.60, 28.64, 29.50 (C-16, C-24, C-32), 30.30, 31.26 (C-5), 32.06, 32.16, 32.38 (C-3), 61.99 (C-12), 72.45 (C-13), 74.93 (C-4), 80.07 (C-15, C-23, C-31), 119.95, 120.15, 120.72, 121.15, 121.39 (C-8, C-19, C-27),

131.32, 132.05, 134.98, 135.19, 135.47, 136.10 (C-7, C-9, C-18, C-20, C-26, C-28), 153.46, 153.98, 156.06, 156.51 (C-6, C-14, C-17, C-22, C-25, C-31), 171.24 (C-11). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für $[C_{134}H_{192}N_{10}NaO_{26}]^+$: m/z 2381.3934, gef.: m/z 2381.3925.

Darstellung von 2,6-Bis-[(*tert.*-butoxycarbonyl)-amino]-pimelinsäure-bis-[5,11,17-tris-[(*tert.*-butoxycarbonyl)-amino]-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid] **28**



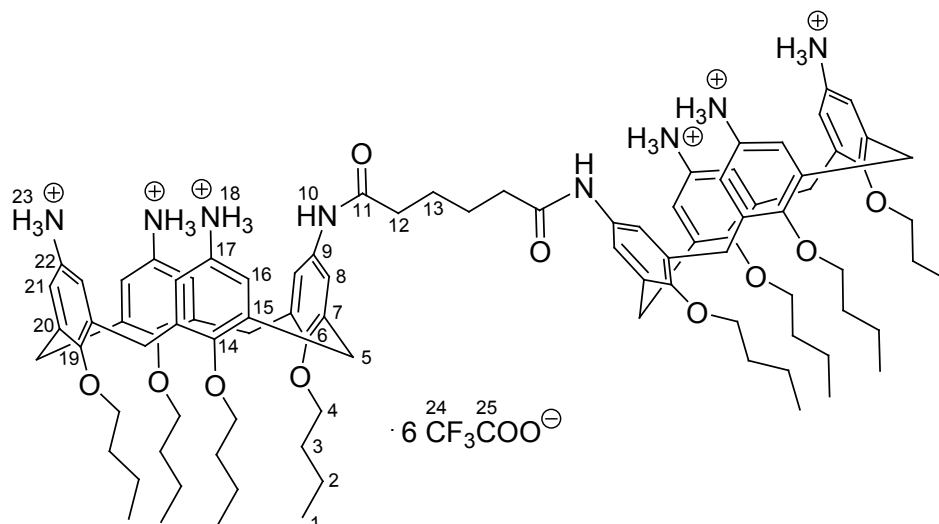
Durchführung:

29 mg Pimelinsäure **26** (0.074 mmol, 1.0 eq.) werden in 40 mL abs. DCM/DMF (3:1) gelöst. 63 mg Cl-HOBt (0.370 mmol, 5.0 eq.), 62 mg HCTU (0.150 mmol, 2.0 eq.) und 74 μ L DIEA (0.450 mmol, 6.0 eq.) werden hinzugegeben und die Mischung 10 min bei 0°C gerührt. 150 mg Calixaren **13** (0.150 mmol, 2.0 eq.), gelöst in 4 mL abs. DCM/DMF (3:1), werden zur Reaktionsmischung hinzu getropft. Die Lösung wird 24 h bei RT gerührt, mit Wasser (3x 30 mL) gewaschen, getrocknet (Na_2SO_4), filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, EA/CH = 1:2) gereinigt und 141 mg (0.059 mmol) des Produkts **28** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 80%. **Schmp.:** 146-150°C. **R_f:** 0.57 (EA/CH = 1:2). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.00 (m, 24 H, H-1), 1.29 (m, 16 H, H-2), 1.49 (s, 18 H, H-18), 1.50 (s, 18 H, H-34), 1.59 (s, 36 H, H-26), 1.71 (m, 2 H, H-14), 1.85 (m, 16 H, H-3), 1.97 (m, 4 H, H-13), 3.08 (m, 8 H, H-5), 3.68 (m, 2 H, H-12), 3.80 (m, 8 H, H-4), 3.89 (m, 8 H, H-4), 4.39 (m, 8 H, H-5), 6.37-6.90 (bs, 24 H, H-8, H-21, H-29). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.10, 14.14, 14.21, 14.25 (C-1), 19.24, 19.35, 19.55, 19.57 (C-2), 22.83 (C-14), 28.60 (C-18, C-26, C-34), 29.84 (C-13), 31.21, 31.27, 31.34 (C-5), 32.06, 32.10, 32.16, 32.39 (C-3), 72.45 (C-12), 74.68, 74.86, 74.94 (C-4), 80.06, 80.25 (C-17, C-25, C-33), 119.77, 119.78, 120.10 (C-8, C-21, C-29), 132.00, 132.14, 132.18, 132.26, 134.52, 134.83, 135.75, 136.22, 137.08 (C-7, C-9, C-20, C-22, C-28, C-30), 153.26, 153.50, 153.69, 153.89, 153.93, 155.77, 156.49 (C-6, C-16, C-19, C-24, C-27, C-32), 170.91 (C-11). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₃₅H₁₉₄N₁₀NaO₂₆]⁺: m/z 2395.4090, gef.: m/z 2395.4026.

5.3.5 Synthese der Anilincalix[4]aren-Dimere 1 bis 6

Darstellung von Adipinsäure-bis-{5,11,17-triamino-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid}-hexa-(trifluoracetat) **1** [112, 204]



Durchführung:

58 mg Boc-Dimer **18** (0.028 mmol) werden in 5 mL abs. DCM gelöst, mit 5 mL TFA versetzt und 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und 60 mg (0.027 mmol) des Produkts **1** in Form eines hellgelben Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 98%. **Schmp.:** >350°C. **¹H-NMR** (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 1.04 (m, 24 H, H-1), 1.42 (sext, 8 H, H-2, $^3J = 7.5$ Hz), 1.58 (sext, 8 H, H-2, $^3J = 7.5$ Hz), 1.76 (bs, 4 H, H-13), 1.93 (m, 16 H, H-3), 2.41 (bs, 4 H, H-12), 3.21 (d, 4 H, H-5, $^2J = 13.5$ Hz), 3.30 (d, 4 H, H-5, $^2J = 13.5$ Hz), 3.86 (m, 8 H, H-4), 4.00 (t, 4 H, H-4, $^3J = 7.9$ Hz), 4.08 (t, 4 H, H-4, $^3J = 7.8$ Hz), 4.51 (dd, 8 H, H-5, $^2J = 13.5$ Hz), 6.48 (d, 4 H, H-16, $^4J = 2.6$ Hz), 6.56 (d, 4 H, H-16, $^4J = 2.7$ Hz), 6.98, (s, 4 H, H-8, H-21), 7.13 (s, 4 H, H-8, H-21). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 14.52, 14.63, 14.68 (C-1), 20.43, 20.50, 20.79 (C-2), 26.57 (C-13), 31.90, 32.06 (C-5), 33.42, 33.52, 33.74 (C-3), 37.62 (C-12), 76.58, 76.67, 76.82 (C-4), 119.31 (C-24), 123.07, 123.49 (C-16), 122.92, 124.38 (C-8, C-21), 126.41, 127.14 134.34 (C-9, C-17, C-22), 136.73, 136.98, 137.90, 138.83 (C-7, C-15, C-20), 154.98, 157.26, 158.60 (C-6, C-14, C-19), 162.85 (C-25), 174.36 (C-11). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₉₄H₁₂₇N₈O₁₀]⁺: m/z 1528.9702, gef.: m/z 1528.9710, ber. für [C₉₄H₁₂₈N₈O₁₀]²⁺: m/z 764.9887, gef.: m/z 764.9870.

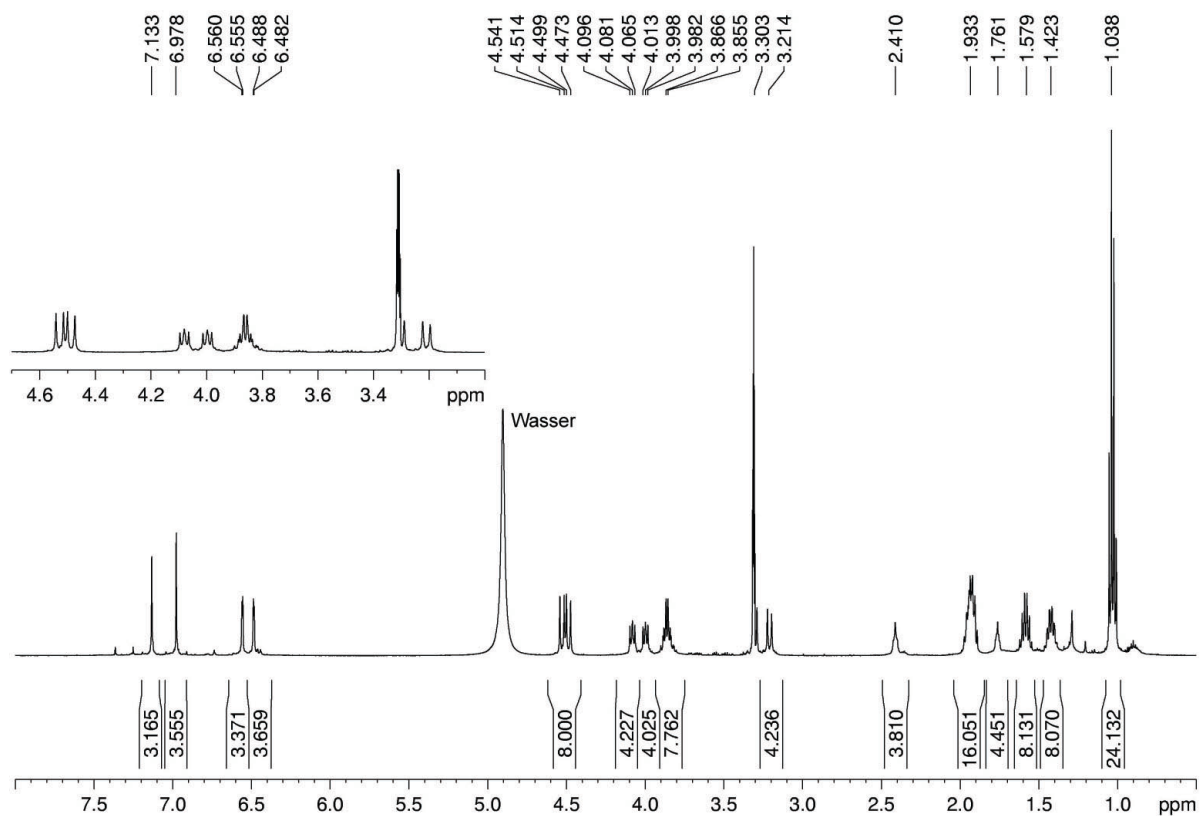
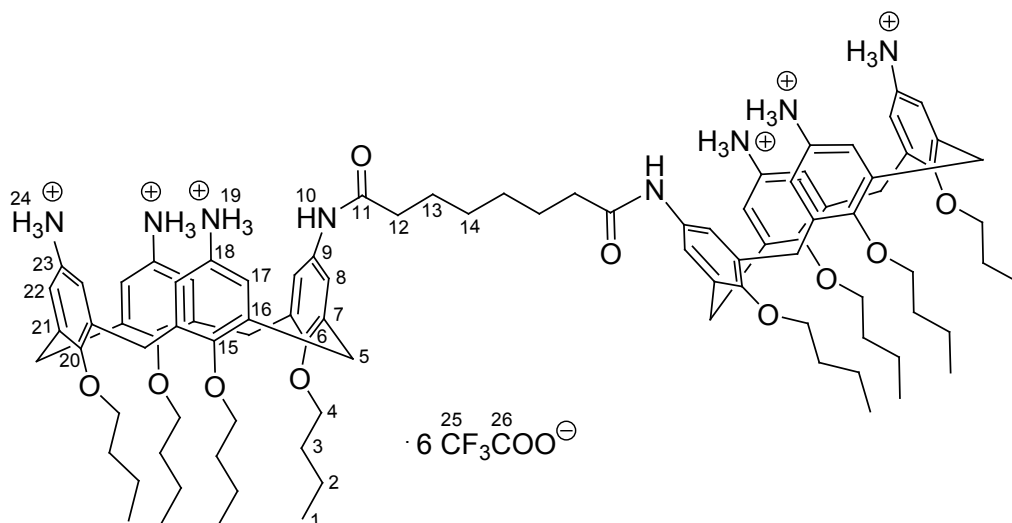


Abbildung 128: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, MeOH-d_4) von **1**.

Darstellung von Octandicarbonsäure-bis-{5,11,17-triamino-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid}-hexa-(trifluoracetat) **2**



Durchführung:

60 mg Boc-Dimer **19** (0.028 mmol) werden in 5 mL abs. DCM gelöst, mit 5 mL TFA versetzt und 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und 60 mg (0.027 mmol) des Produkts **2** als hellgelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 96%. **Schmp.:** >350°C. **¹H-NMR** (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 1.04 (m, 24 H, H-1), 1.44 (m, 12 H, H-2, H-14), 1.57 (m, 8 H, H-2), 1.70 (bs, 4 H, H-13), 1.94 (m, 16 H, H-3), 2.35 (t, 4 H, H-12, ³*J* = 6.5 Hz), 3.22 (d, 4 H, H-5, ²*J* = 13.5 Hz), 3.31 (d, 4 H, H-5, ²*J* = 13.5 Hz), 3.88 (m, 8 H, H-4), 3.91 (t, 4 H, H-4, ³*J* = 7.5 Hz), 4.02 (t, 4 H, H-4, ³*J* = 7.6 Hz), 4.47 (dd, 8 H, H-5, ²*J* = 13.5 Hz), 6.58 (d, 4 H, H-17, ⁴*J* = 4.5 Hz), 6.65 (d, 4 H, H-17, ⁴*J* = 4.5 Hz), 6.95, (s, 4 H, H-8, H-22), 7.09 (s, 4 H, H-8, H-22). **¹³C-NMR** (126.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 14.52, 14.59, 14.63, 14.69 (C-1), 20.42, 20.49, 20.62, 20.67 (C-2), 26.90 (C-13), 30.32 (C-14), 31.93, 32.09 (C-5), 33.44, 33.53, 33.67, 33.76 (C-3), 37.32 (C-12), 76.56, 76.64, 76.75 (C-4), 119.34 (C-25), 122.90, 123.08 (C-17), 122.66, 124.27 (C-8, C-22), 126.58, 128.02, 134.32 (C-9, C-18, C-23), 136.88, 136.92, 137.81, 138.97 (C-7, C-16, C-21), 155.10, 156.88, 158.63 (C-6, C-15, C-20), 162.99 (C-26), 174.75 (C-11). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₉₆H₁₃₀N₈NaO₁₀]⁺: *m/z* 1578.9834, gef.: *m/z* 1578.9491.

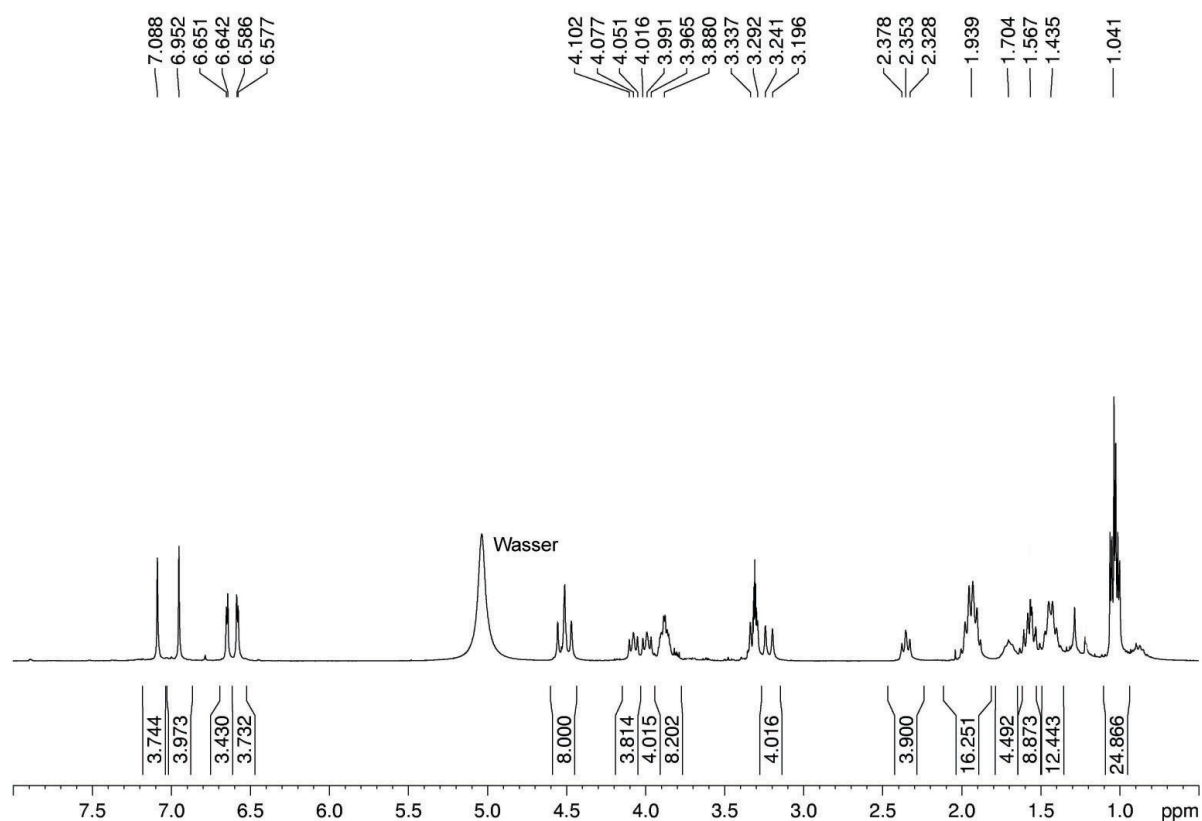
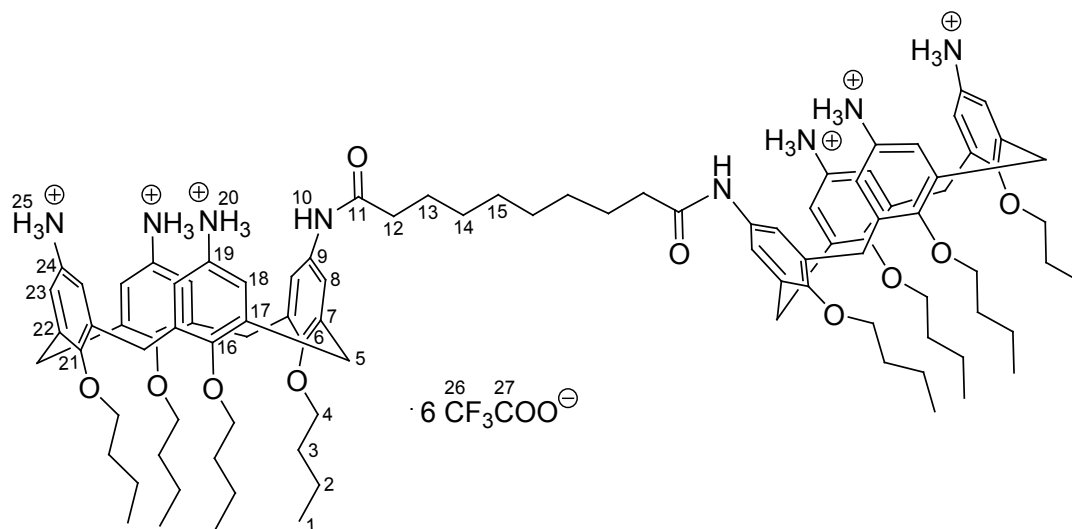


Abbildung 129: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, MeOH-d_4) von **2**.

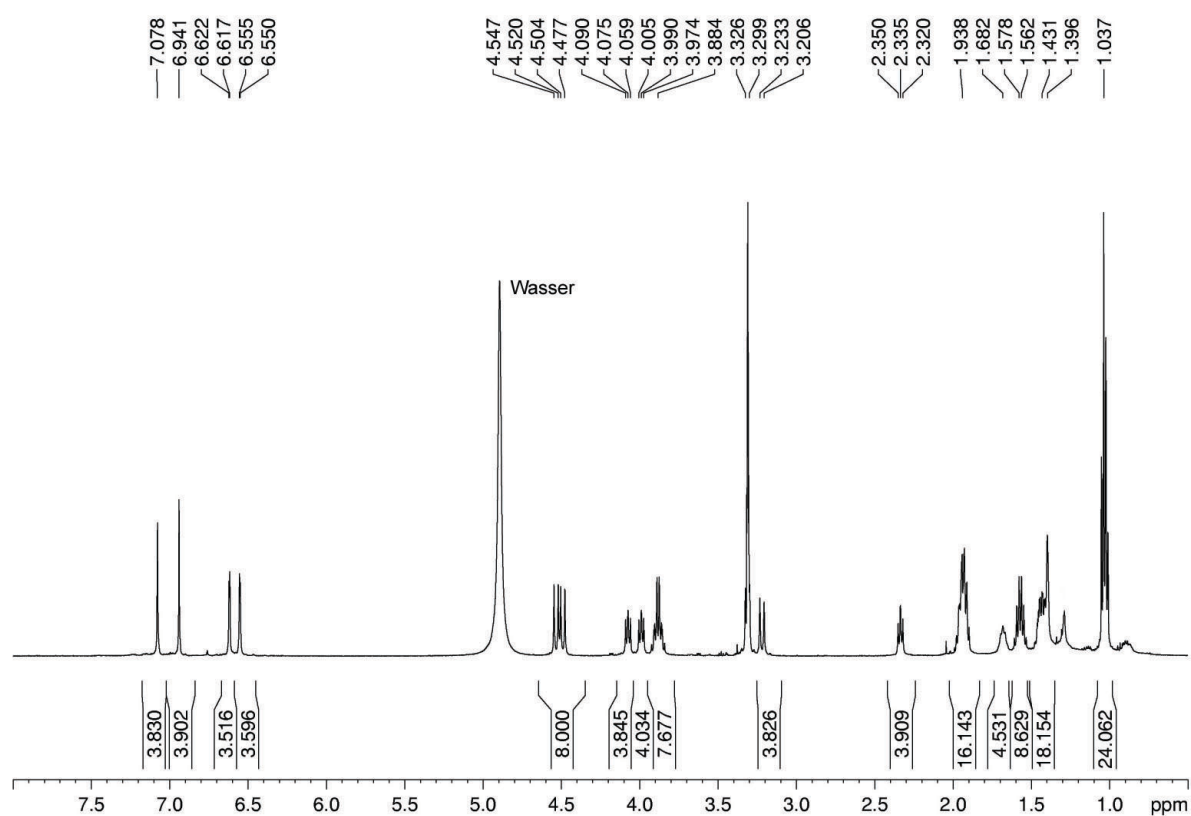
Darstellung von Sebacinsäure-bis-{5,11,17-triamino-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]-aren-23-amid}-hexa-(trifluoracetat) 3



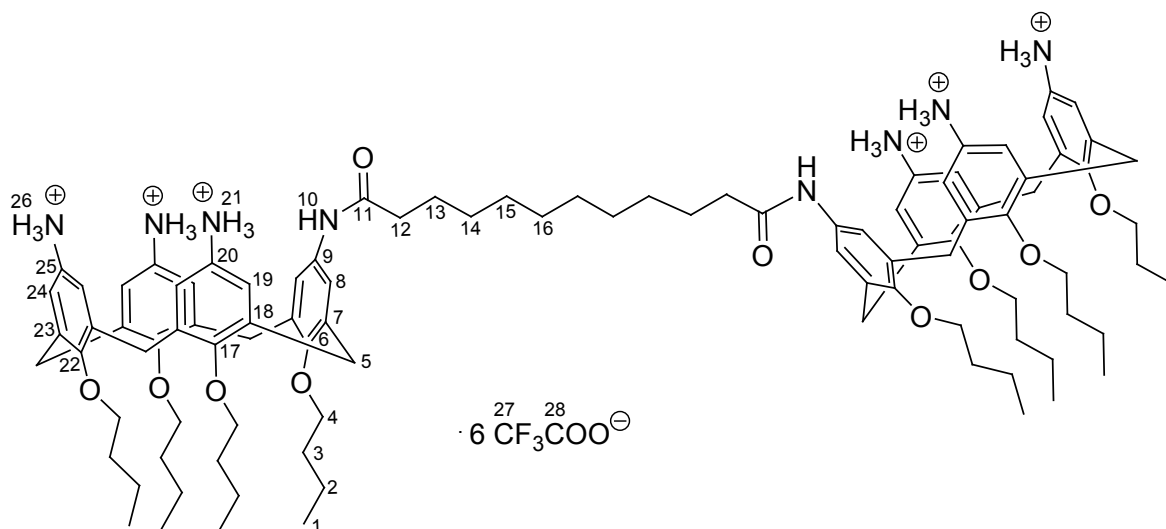
Durchführung:

62 mg Boc-Dimer **20** (0.028 mmol) werden in 5 mL abs. DCM gelöst, mit 5 mL TFA versetzt und 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und 62 mg (0.027 mmol) des Produkts **3** in Form eines hellbraunen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 98%. **Schmp.:** >350°C. **¹H-NMR** (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 1.04 (m, 24 H, H-1), 1.40-1.43 (m, 16 H, H-2, H-14, H-15), 1.57 (sext, 8 H, H-2, $^3J = 7.7$ Hz), 1.68 (m, 4 H, H-13), 1.94 (m, 16 H, H-3), 2.34 (t, 4 H, H-12, $^3J = 7.5$ Hz), 3.22 (d, 4 H, H-5, $^2J = 13.5$ Hz), 3.31 (d, 4 H, H-5, $^2J = 13.5$ Hz), 3.88 (m, 8 H, H-4), 3.99 (t, 4 H, H-4, $^3J = 7.7$ Hz), 4.07 (t, 4 H, $^3J = 7.8$ Hz), 4.51 (dd, 8 H, $^3J = 13.5$ Hz), 6.55 (d, 4 H, H-18, $^4J = 2.6$ Hz), 6.62 (d, 4 H, H-18, $^4J = 2.6$ Hz), 6.94 (s, 4 H, H-8, H-23), 7.08 (s, 4 H, H-8, H-23). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 14.53, 14.62, 14.68 (C-1), 20.46, 20.53, 20.76 (C-2), 27.00 (C-13), 30.53, 30.57 (C-14, C-15), 31.89, 32.05 (C-5), 33.43, 33.54, 33.73 (C-3), 37.98 (C-12), 76.60, 76.69, 76.88 (C-4), 119.59 (C-26), 123.35, 123.75 (C-18), 122.95, 124.38 (C-8, C-23), 126.29, 126.58, 134.34 (C-9, C-19, C-24), 136.54, 137.13, 138.07, 138.69 (C-7, C-17, C-22), 157.57 (C-16), 154.88, 158.55 (C-6, C-21), 162.12, 162.84 (C-27), 174.87 (C-11). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₉₈H₁₃₅N₈O₁₀]⁺: m/z 1585.0328, gef.: m/z 1585.0317, ber. für [C₉₈H₁₃₄N₈NaO₁₀]⁺: m/z 1607.0147, gef.: m/z 1607.0122, ber. für [C₉₈H₁₃₆N₈O₁₀]²⁺: m/z 793.0200, gef.: m/z 793.0220.

Abbildung 130: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, MeOH-d₄) von **3**.

Darstellung von Dodecandisäure-bis-{5,11,17-triamino-25,26,27,28-tetrabutoxy-calix[4]aren-23-amid}-hexa-(trifluoracetat) **4**



Durchführung:

62 mg Boc-Dimer **21** (0.028 mmol) werden in 5 mL abs. DCM gelöst, mit 5 mL TFA versetzt und 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und 59 mg (0.026 mmol) **4** als dunkelbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 92%. **Schmp.:** >350°C. **¹H-NMR** (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 1.01 (m, 24 H, H-1), 1.37 (m, 20 H, H-2, H-14, H-15, H-16), 1.59 (m, 8 H, H-2), 1.68 (bs, 4 H, H-13), 1.88 (m, 16 H, H-3), 2.34 (t, 4 H, H-12, ³*J* = 6.5 Hz), 3.16 (d, 4 H, H-5, ²*J* = 13.7 Hz), 3.25 (d, 4 H, H-5, ²*J* = 13.5 Hz), 3.80 (m, 8 H, H-4), 4.02 (t, 4 H, H-4, ³*J* = 7.7 Hz), 4.08 (t, 4 H, ³*J* = 7.5 Hz), 4.46 (d, 4 H, H-5, ²*J* = 13.4 Hz), 4.50 (d, 4 H, ²*J* = 13.5 Hz), 6.23 (s, 4 H, H-19), 6.32 (s, 4 H, H-19), 6.98 (s, 4 H, H-8, H-24), 7.16 (s, 4 H, H-8, H-24). **¹³C-NMR** (176 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 14.08, 14.42, 14.51, 14.57 (C-1), 20.25, 20.32, 20.49, 20.74 (C-2), 27.00 (C-13), 30.50, 30.56, 30.67 (C-14, C-15, C-16), 31.86, 32.00 (C-5), 33.32, 33.41, 33.49, 33.64 (C-3), 37.92 (C-12), 76.38, 76.43, 76.50 (C-4), 119.10 (C-27), 121.96, 122.72 (C-19), 121.51, 123.82 (C-8, C-24), 126.10, 126.31, 134.11 (C-9, C-20, C-25), 136.51, 137.28, 137.40, 139.21 (C-7, C-18, C-23), 155.80 (C-17), 155.28, 158.49 (C-6, C-22), 162.47 (C-28), 174.70 (C-11). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₀₀H₁₃₉N₈O₁₀]⁺: *m/z* 1613.0605, gef.: *m/z* 1613.0677, ber. für [C₁₀₀H₁₄₀N₈O₁₀]²⁺: *m/z* 807.0339, gef.: *m/z* 807.0371.

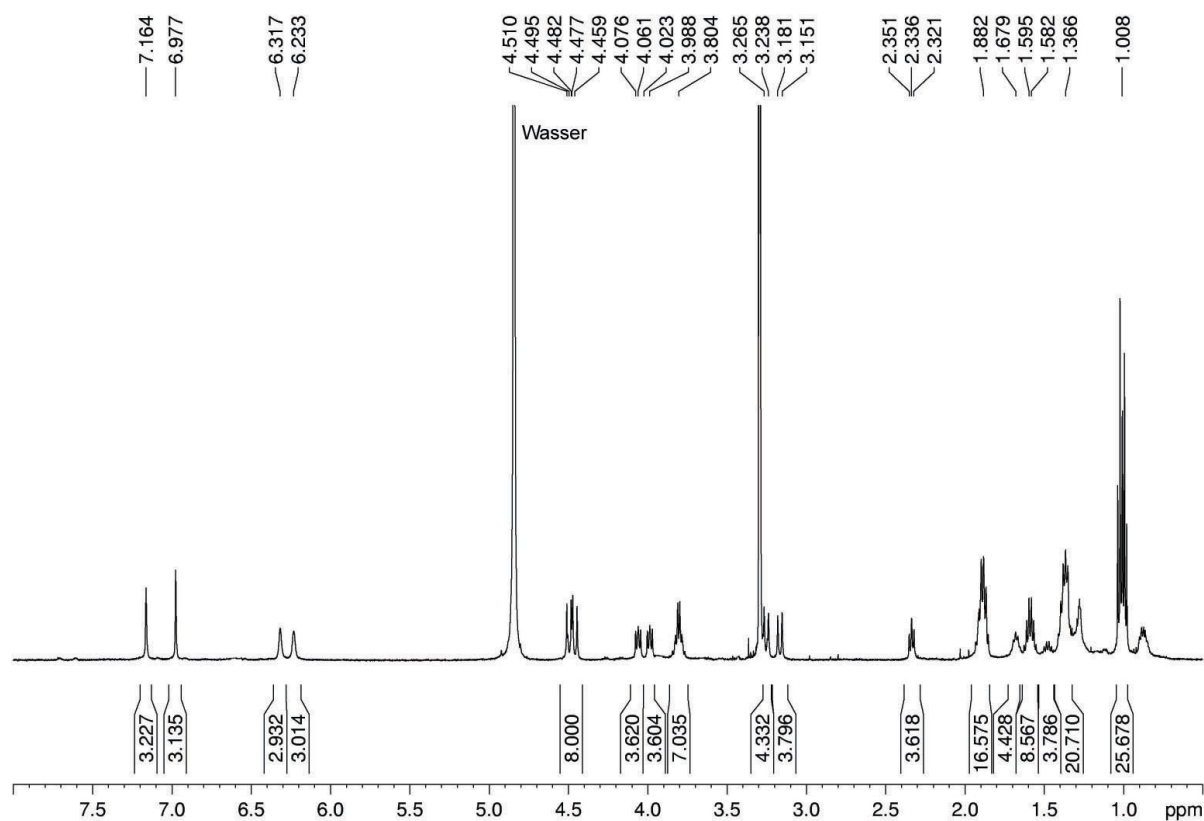
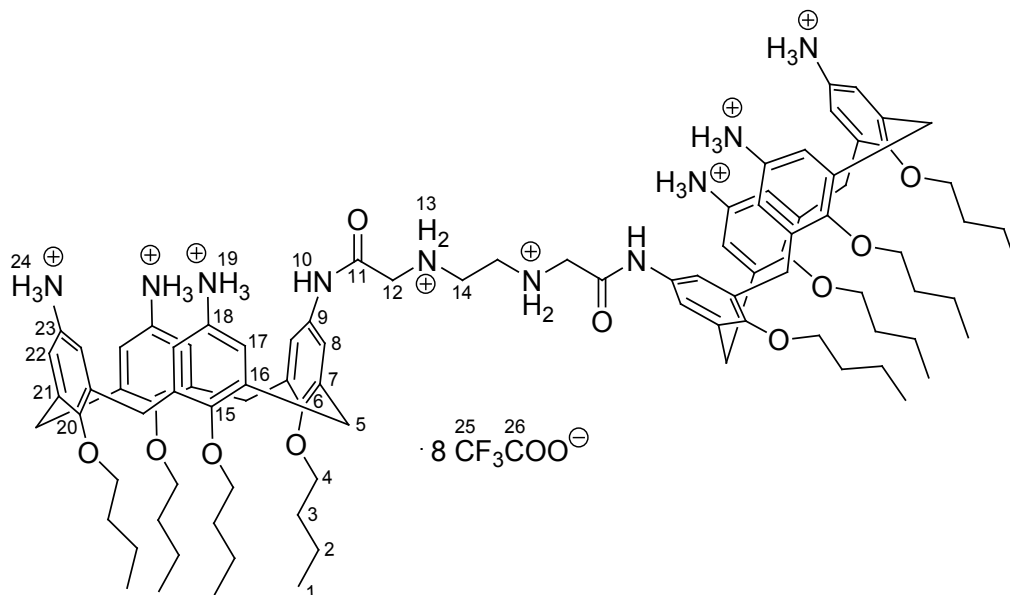


Abbildung 131: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, MeOH-d_4) von 4.

Darstellung von Ethylendiamin-*N,N'*-diessigsäure-bis-{5,11,17-triamino-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid}-octa-(trifluoracetat) **5**



Durchführung:

54 mg Boc-Dimer **27** (0.028 mmol) werden in 5 mL abs. DCM gelöst, mit 5 mL TFA versetzt und 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und 50 mg (0.022 mmol) des Produkts **5** in Form eines dunkelbraunen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 97%. **Schmp.:** >350°C. **¹H-NMR** (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 1.02 (m, 24 H, H-1), 1.39 (sext, 8 H, H-2, $^3J = 7.5$ Hz), 1.60 (sext, 8 H, H-2, $^3J = 7.6$ Hz), 1.92 (m, 16 H, H-3), 3.18 (d, 4 H, H-5, $^2J = 13.2$ Hz), 3.29 (d, 4 H, H-5), 3.56 (t, 4 H, H-14, $^3J = 5.0$ Hz), 3.68 (t, 4 H, H-12, $^3J = 4.5$ Hz), 3.82 (m, 8 H, H-4), 4.02 (t, 4 H, H-4, $^3J = 7.8$ Hz), 4.09 (t, 4 H, H-4, $^3J = 7.9$ Hz), 4.49 (dd, 8 H, $^2J = 13.0$ Hz), 6.38 (s, 4 H, H-17), 6.45 (s, 4 H, H-17), 7.04 (s, 4 H, H-8, H-22), 7.24 (s, 4 H, H-8, H-22). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 14.49, 14.55, 14.63, 14.68 (C-1), 20.36, 20.43, 20.84 (C-2), 31.91, 32.05 (C-5), 33.38, 33.47, 33.58, 33.77 (C-3), 62.37 (C-12), 73.62 (C-14), 76.52, 76.62, 76.78 (C-4), 119.11 (C-25), 122.84, 123.28 (C-17), 122.17, 124.42 (C-8, C-22), 126.58, 127.50, 133.68 (C-9, C-18, C-23), 136.68, 137.26, 137.54, 139.07 (C-7, C-16, C-21), 155.33, 156.94, 158.71 (C-6, C-15, C-20), 162.91 (C-26), 165.05 (C-11). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₉₄H₁₂₉N₁₀NaO₁₀]⁺: m/z 1558.9919, gef.: m/z 1558.9880.

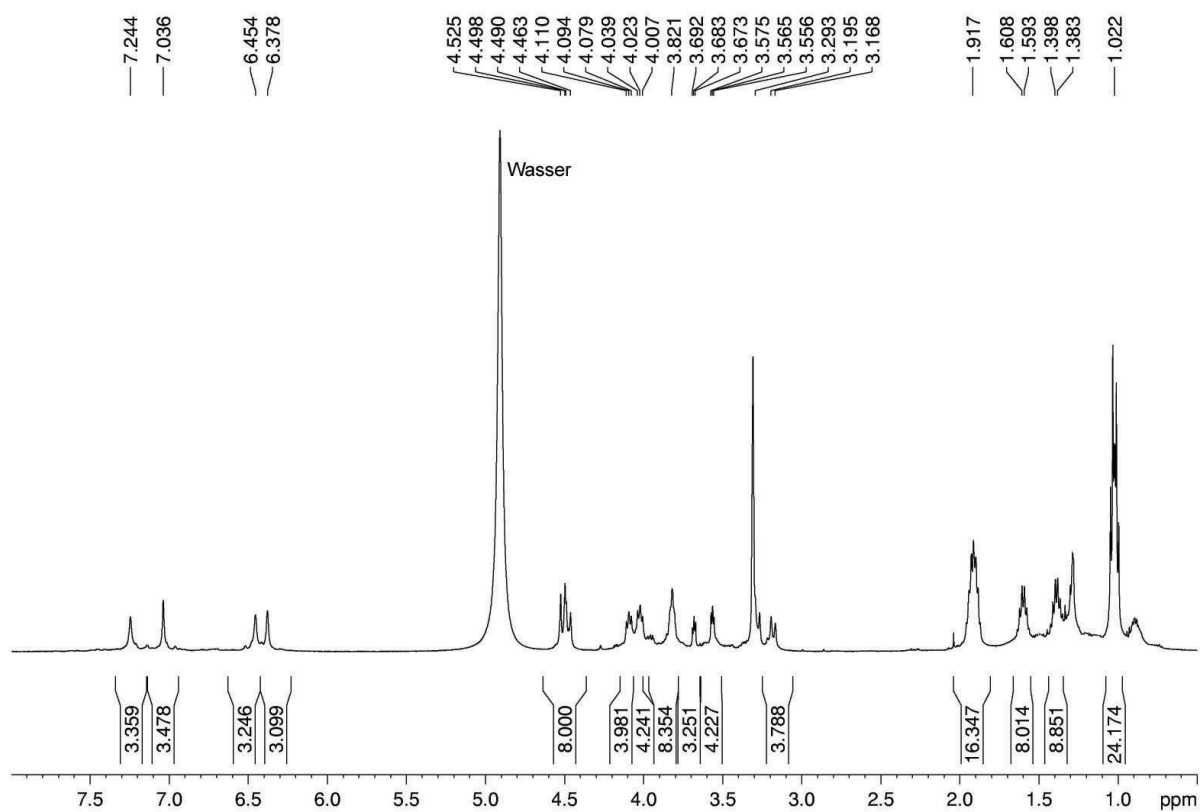
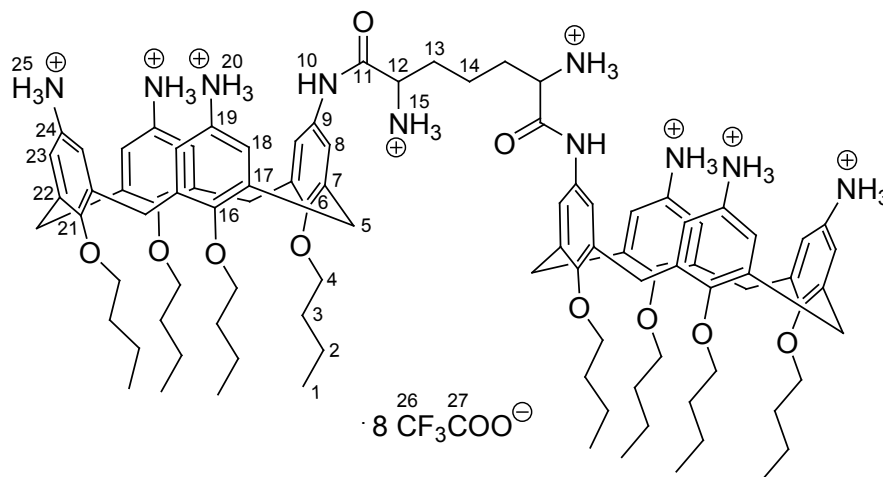


Abbildung 132: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, MeOH-d₄) von 5.

Darstellung von 2,6-Diaminopimelinsäure-bis-{5,11,17-tri-amino-25,26,27,28-tetra-butoxycalix[4]aren-23-amid}-octa-(trifluoracetat) 6



Durchführung:

27 mg Boc-Dimer **28** (0.011 mmol) werden in 5 mL abs. DCM gelöst, mit 5 mL TFA versetzt und 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und 28 mg (0.010 mmol) **6** als brauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 95%. **Schmp.:** >350°C. **¹H-NMR** (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 1.02 (m, 24 H, H-1), 1.34 (m, 10 H, H-2, H-14), 1.63 (m, 8 H, H-2), 1.88 (m, 16 H, H-3), 2.03 (m, 2 H, H-13), 2.11 (m, 2 H, H-13), 3.15 (m, 4 H, H-5), 3.24 (m, 4 H, H-5), 3.75 (m, 8 H, H-4), 3.93 (t, 2 H, H-12, ³*J* = 7.4 Hz), 4.02 (m, 4 H, H-4), 4.09 (m, 4 H, H-4), 4.48 (m, 8 H, H-5), 6.10 (bs, 4 H, H_{Ar}), 6.14 (bs, 4 H, H_{Ar}), 6.57 (bs, 4 H, H_{Ar}), 7.05 (s, 2 H, H_{Ar}), (s, 2 H, H_{Ar}). **¹³C-NMR** (176 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 14.49, 14.57, 14.68, 14.74 (C-1), 20.41, 20.63, 20.94, 20.96 (C-2), 23.89 (C-14), 30.92 (C-13), 32.00, 32.17 (C-5), 33.47, 33.64, 33.84 (C-3), 62.41 (C-12), 76.41, 76.48, 76.52, 76.57 (C-4), 117.44, 119.10, 122.44, 122.54, 122.62, 123.78, 133.37, 133.50, 136.34, 136.95, 138.06, 138.14, 139.52, 139.61, 156.07, 162.95, 163.14 (C_{Ar}, C_q), 168.15 (C-11). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₉₅H₁₉₄N₁₀NaO₂₆]⁺: *m/z* 1593.9895, gef.: *m/z* 1593.4728.

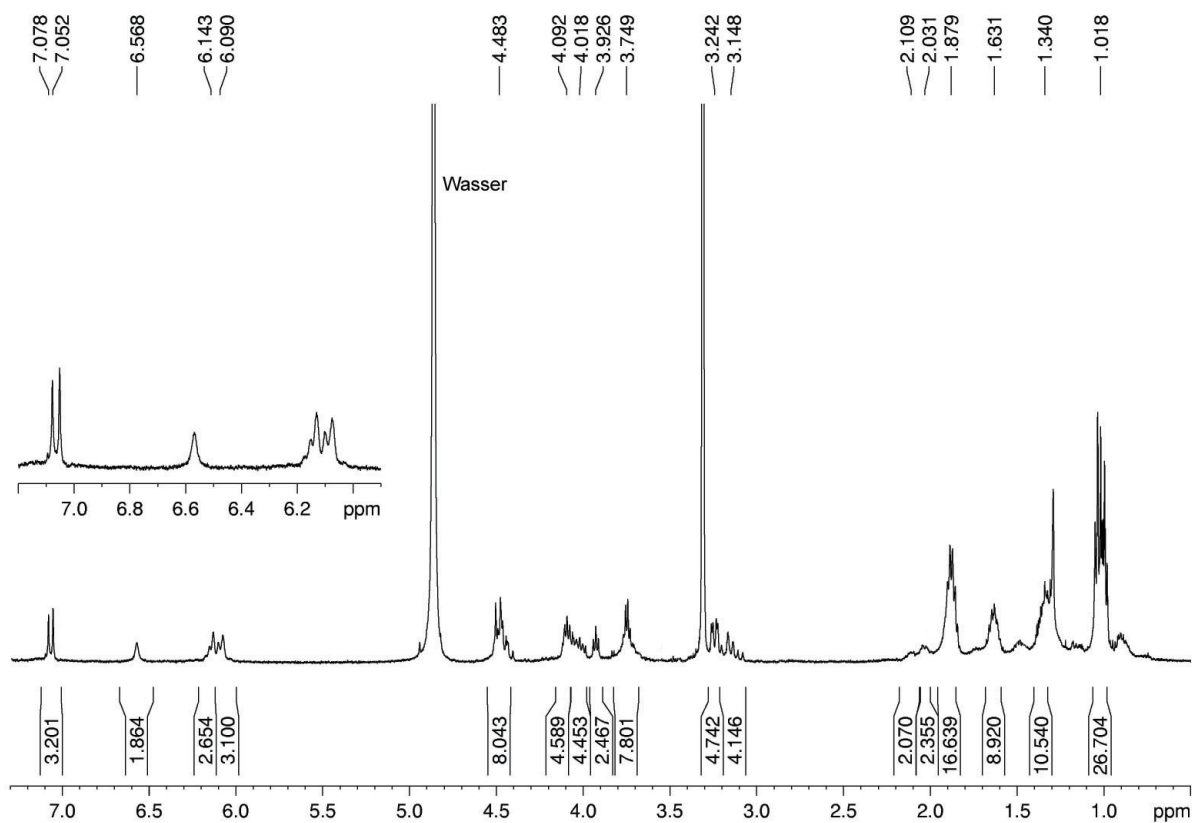
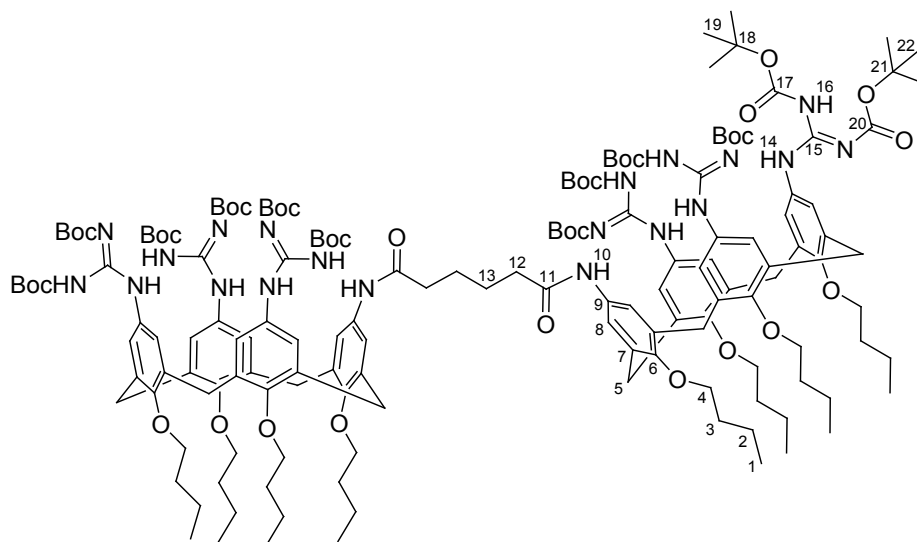


Abbildung 133: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, MeOH-d₄) von 6.

5.3.6 Synthese der Guanidiniumcalix[4]aren-Dimere **30** und **7**

Darstellung von Adipinsäure-bis-{5,11,17-tris-[(*N,N'*-di-*tert*-butoxycarbonyl)-guanidin]-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid} **30**

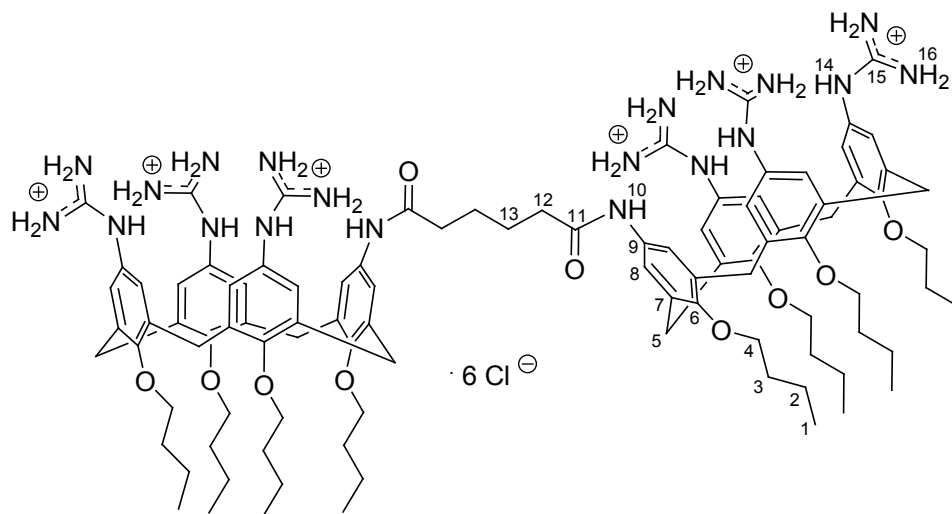


Durchführung:

261 mg Calixaren-Dimer **1** (0.118 mmol, 1.0 eq.) werden in 40 mL abs. DCM/abs. DMF (1:1) gelöst. Nacheinander werden 330 μ L Triethylamin (2.360 mmol, 20.0 eq.), 127 mg AgNO_3 (0.755 mmol, 6.4 eq.) und 206 mg *N,N'*-Bis-(*tert*-butoxycarbonyl)-2-methyl-2-thiopseudo-harnstoff (0.708 mmol, 6.0 eq.) zugegeben und die Suspension 48 h bei RT gerührt. Der Feststoff wird abfiltriert, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, EA/CH = 3:1) gereinigt. Es werden 250 mg (0.084 mmol) des Produkts **30** in Form eines gelben Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 71%. **Schmp.:** 393°C (Zers.). **R_f:** 0.98 (EA/CH = 3:1). **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.97 (m, 24 H, H-1), 1.25 (m, 16 H, H-2), 1.50 (m, 112 H, H-13, H-19, H-22), 1.82 (m, 20 H, H-3, H-12), 3.09 (m, 8 H, H-5), 3.64 (m, 8 H, H-4), 4.01 (m, 8 H, H-4), 4.37 (m, 8 H, H-5), 6.14 (s, 2 H, H-8), 6.39 (s, 2 H, H-8), 7.20 (s, 4 H, H-8), 7.32 (s, 4 H, H-8), 7.52 (s, 2 H, H-8), 7.71 (s, 2 H, H-8), 9.50 (s, 2 H, H-10), 10.22 (s, 6 H, H-14), 11.70 (s, 6 H, H-16). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.10, 14.27, 14.32, 14.55 (C-1), 19.16, 19.72 (C-2), 26.86 (C-13), 28.18, 28.28, 28.39 (C-19, C-22), 31.39, 31.47, 31.92 (C-5), 32.08, 32.59 (C-3), 36.1 (C-12), 74.94 (C-4), 83.54 (C-18, C-21), 122.21, 122.42, 122.97 (C-8), 128.99, 130.66, 131.05, 133.42, 133.68, 136.21, 153.33, 153.49, 154.99, 163.78, 167.85 (C_q), 171.59 (C-11). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für $[\text{C}_{95}\text{H}_{194}\text{N}_{10}\text{NaO}_{26}]^+$: m/z 1594.9895, gef.: m/z 1593.4728.

Darstellung von Adipinsäure-bis-{5,11,17-tri-(guanidinium)]-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid}-hexa-hydrochlorid **7**



Durchführung:

61 mg Calixaren-Dimer **30** (0.02 mmol) werden in 10 mL 1,4-Dioxan gelöst, tropfenweise mit 6 mL konz. HCl versetzt und 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt mit Ethylacetat versetzt und erneut eingeeengt. Nach Trocknen im HV werden 40 mg (0.02 mmol) des hellbraunen Produkts **7** erhalten.

Ausbeute: quant. **Schmp.:** >350°C. **¹H-NMR** (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 1.05 (m, 24 H, H-1), 1.49 (m, 8 H, H-2), 1.54 (m, 8 H, H-2), 1.72 (m, 4 H, H-13), 1.97 (m, 16 H, H-3), 2.41 (m, 4 H, H-12), 3.23 (d, 4 H, H-5, $^2J = 14.3$ Hz), 3.29 (d, 4 H, H-5, $^2J = 14.3$ Hz), 3.94 (m, 12 H, H-4), 4.02 (t, 4 H, H-4, $^3J = 7.1$ Hz), 4.49 (dd, 8 H, H-5, $^2J = 14.2$ Hz), 6.60 (bs, 4 H, H-8), 6.61 (bs, 4 H, H-8), 6.74 (s, 4 H, H-8), 7.04 (s, 4 H, H-8). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 14.64 (C-1), 20.63, 20.76 (C-2), 26.55 (C-13), 31.76, 32.05 (C-5), 33.60, 33.75 (C-3), 37.65 (C-12), 76.51, 76.75 (C-4), 122.30, 126.48, 126.69 (C-8), 129.81, 133.74 (C_q), 134.28 (C-9), 136.37 (C-7), 137.56 (C_q), 138.07 (C-7), 154.62 (C-6), 157.16, 157.45, 157.88 (C_q), 158.08 (C-15), 174.26 (C-11). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₀₀H₁₃₈N₂₀NaO₁₀]⁺: m/z 1803.0827, gef.: m/z 1803.7475.

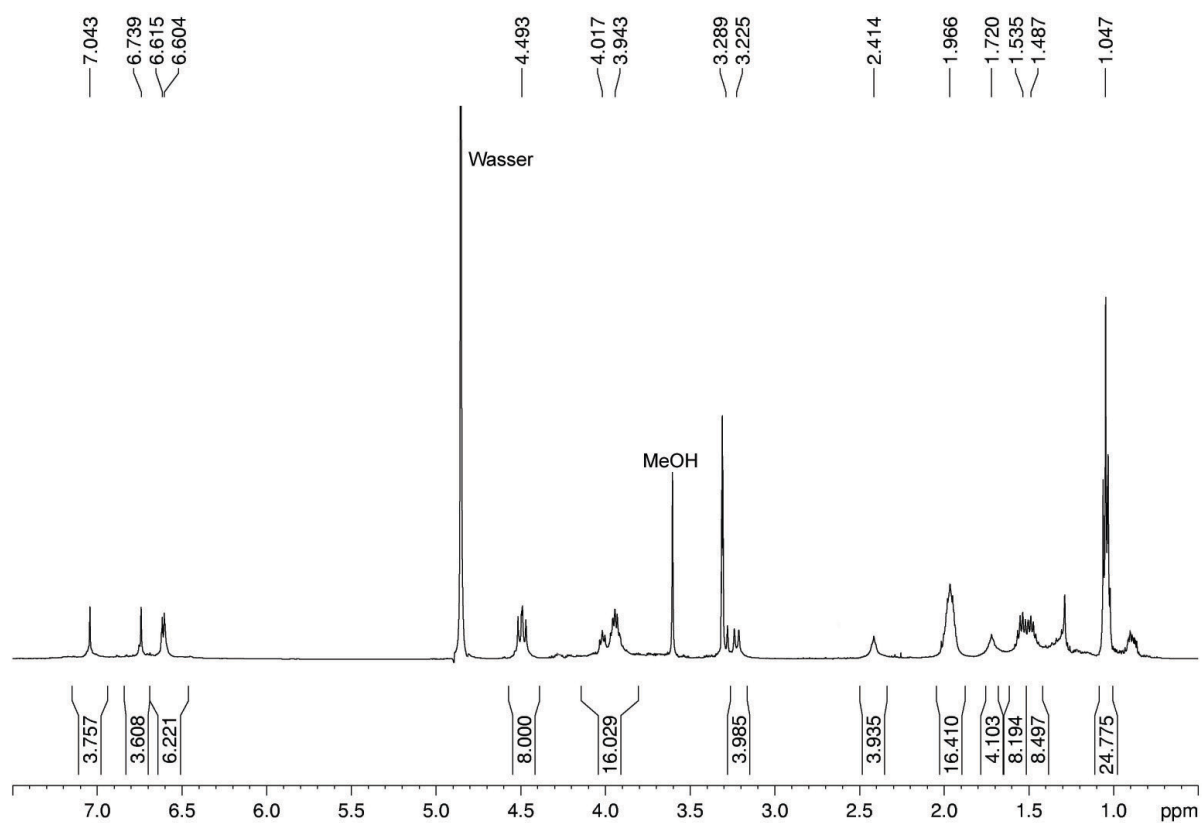
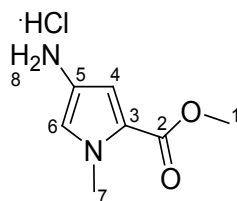


Abbildung 134: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, MeOH-d₄) von 7.

5.3.7 Synthese der Pyrrolmonomere

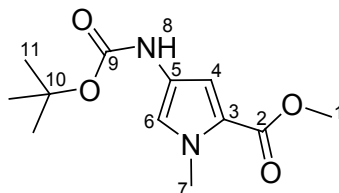
Darstellung von 4-Amino-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid **41**^[187]



Durchführung:

2.0 g Nitropyrrol **40** (10.9 mmol, 1.0 eq.) werden vollständig in 200 mL Methanol gelöst, mit 1.2 mL konz. HCl (12.0 mmol, 1.1 eq.) und 0.2 g Pd/C (10w%) versetzt und 48 h bei RT unter starkem Rühren hydriert. Die Suspension wird über Celite filtriert, mit Methanol (3x 100 mL) gewaschen und das Filtrat eingengt. Der Rückstand wird zweimal mit Ethylacetat aufgenommen und das Lösungsmittel entfernt. Nach Trocknen im HV werden 2.06 g (10.85 mmol) des Produkts **41** in Form eines hellgelben Feststoffs erhalten.

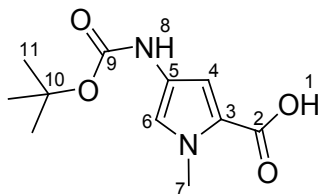
Ausbeute: quant. **Schmp.:** 266°C (Zers.). **R_f:** 0.0 (EA). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.73 (s, 3 H, H-1), 3.84 (s, 3 H, H-7), 6.80 (d, 1 H, H-4, $^4J = 2.1$ Hz), 7.25 (d, 1 H, H-6, $^4J = 2.1$ Hz), 10.25 (bs, 3 H, H-8). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 36.57 (C-7), 51.32 (C-1), 111.49 (C-4), 113.87 (C-5), 120.83 (C-3), 123.80 (C-6), 160.27 (C-2). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₇H₁₁N₂O₂]⁺: m/z 155.0815, gef.: m/z 155.0827.

Darstellung von 4-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäuremethylester **43^[187]****Durchführung:**

1.0 g Aminopyrrol **41** (5.3 mmol, 1.0 eq.) werden mit 10 mL 10% wässr. Na₂CO₃-Lösung und 60 mL 1,4-Dioxan versetzt. 1.2 g Boc₂O (5.9 mmol, 1.1 eq.), gelöst in 10 mL 1,4-Dioxan, werden über 30 min zu der Lösung getropft und diese 24 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird das Rohprodukt mit 60 mL DCM versetzt, vom Feststoff befreit, eingengt und im HV getrocknet. Es werden 1.32 g (5.20 mmol) **43** als hellgelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 98% **Schmp.:** 114°C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.44 (s, 9 H, H-11), 3.70 (s, 3 H, H-1), 3.78 (s, 3 H, H-7), 6.62 (s, 1 H, H-4), 7.10 (s, 1 H, H-6), 9.10 (s, 1 H, H-8). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 28.14 (C-11), 36.06 (C-7), 50.86 (C-1), 78.52 (C-10), 107.34 (C-4), 118.63 (C-3), 119.22 (C-6), 123.11 (C-5), 152.70 (C-9), 160.72 (C-2). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₂H₁₉N₂O₄]⁺: *m/z* 255.1339, gef.: *m/z* 255.1320; ber. für [C₁₂H₁₈N₂NaO₄]⁺: *m/z* 277.1159, gef.: *m/z* 277.1162; (ESI-neg., MeOH): ber. für [C₁₂H₁₇N₂O₄]⁻: *m/z* 253.1194, gef.: *m/z* 253.1198.

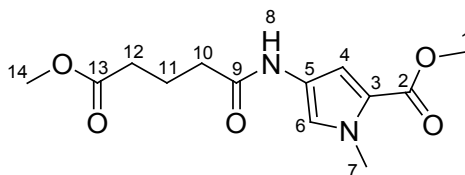
Darstellung von 4-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure **42^[187]**



Durchführung:

1.5 g Pyrrolmethylester **43** (5.9 mmol, 1.0 eq.) werden in 80 mL MeOH gelöst, mit 7.5 mL 2 M NaOH versetzt und 48 h bei 60°C gerührt. Nach Erkalten werden zu der Lösung 120 mL Wasser gegeben und mit Diethylether (3x 120 mL) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird mit 10% H₂SO₄ auf pH 3 eingestellt und sofort mit Ethylacetat (3x 120 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet (Na₂SO₄), filtriert und eingeeengt. Das Rohprodukt wird in einer geringen Menge DCM gelöst, mit Diethylether versetzt und das Lösungsmittel entfernt, bis ein heller Schaum entsteht (evtl. Vorgang wiederholen). Nach Trocknen im HV werden 1.2 g (5.0 mmol) des Produkts **42** als hellgelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 85%. **Schmp.:** 160°C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.43 (s, 9 H, H-11), 3.76 (s, 3 H, H-7), 6.57 (d, 1 H, H-4 ⁴*J* = 1.6 Hz), 7.04 (d, 1 H, H-6, ⁴*J* = 1.6 Hz), 9.06 (s, 1 H, H-8), 12.10 (bs, 1 H, H-1). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 28.16 (C-11), 36.03 (C-7), 78.42 (C-10), 107.44 (C-4), 118.74 (C-6), 119.63 (C-3), 122.80 (C-5), 152.72 (C-9), 161.86 (C-2). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₁H₁₇N₂O₄]⁺: *m/z* 263.1002, gef.: *m/z* 263.1002; ber. für [C₁₁H₁₆N₂NaO₄]⁺: *m/z* 263.1002, gef.: *m/z* 263.1004; (ESI-neg., MeOH): ber. für [C₁₁H₁₅N₂O₄]⁻: *m/z* 239.1037, gef.: *m/z* 239.1046.

Darstellung von 4-(5-Methoxy-5-oxopentanamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäuremethylester 46**Durchführung:**

150 mg Aminopyrrol **41** (0.79 mmol, 1.0 eq.) werden in 30 mL abs. DCM/abs. DMF 2:1 gelöst, mit 110 µL Glutarsäuremonomethylesterchlorid **45** (0.79 mmol, 1.0 eq.), 200 µL DIEA (1.19 mmol, 1.5 eq.) und einer katalytischen Menge DMAP versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit 20 mL DCM versetzt und mit 0.5 M HCl (2x 50 mL) und Wasser (3x 50 mL) gewaschen, getrocknet (Na₂SO₄), filtriert und eingeeengt. Nach Trocknen im HV werden 175 mg (0.62 mmol) des Produkts **46** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 78%. **Schmp.:** 130°C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.80 (qt, 2 H, H-11, ³*J* = 7.4 Hz), 2.25 (t, 2 H, H-10, ³*J* = 7.4 Hz), 2.23 (t, 2 H, H-12, ³*J* = 7.4 Hz), 3.58 (s, 3 H, H-14), 3.71 (s, 3 H, H-1), 3.80 (s, 3 H, H-7), 6.69 (d, 1 H, H-4, ⁴*J* = 2.0 Hz), 7.32 (d, 1 H, H-6, ⁴*J* = 2.0 Hz), 9.83 (s, 1 H, H-8). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 20.56 (C-11), 32.65 (C-12), 34.50 (C-10), 36.17 (C-7), 50.97 (C-1), 51.29 (C-14), 107.69 (C-4), 118.61 (C-3), 120.45 (C-6), 122.72 (C-5), 160.77 (C-2), 168.95 (C-13), 173.09 (C-9). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₃H₁₉N₂O₅]⁺: *m/z* 283.1288, gef.: *m/z* 283.1296; ber. für [C₁₃H₁₈N₂NaO₅]⁺: *m/z* 305.1108, gef.: *m/z* 305.1121; (ESI-neg., MeOH): ber. für [C₁₃H₁₇N₂O₅]⁻: *m/z* 281.1143, gef.: *m/z* 281.1142.

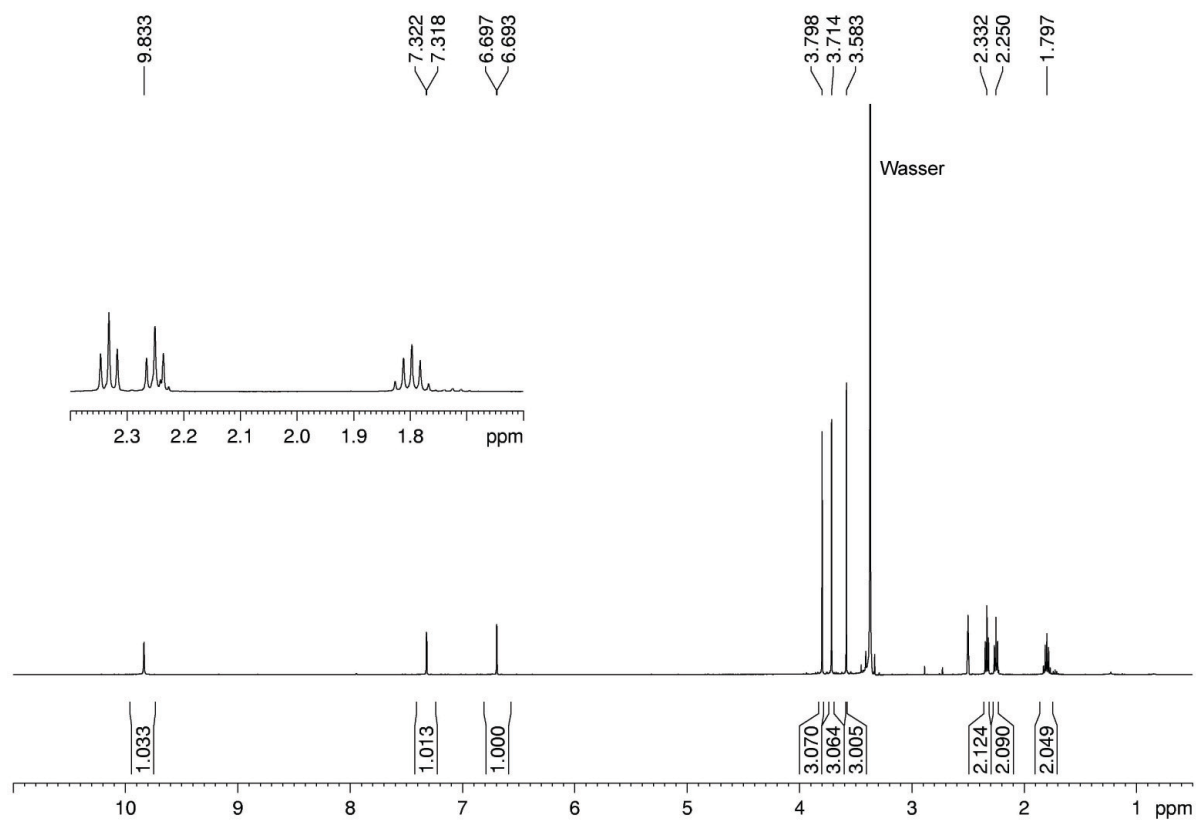
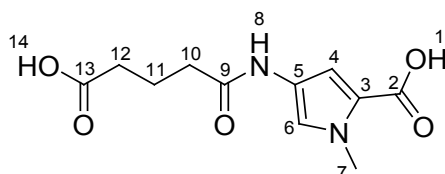


Abbildung 135: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von **46**.

Darstellung von 4-(4-Carboxybutanamido)-1-methyl-1H-pyrrol-2-carbonsäure 47**Durchführung:**

148 mg Diester **46** (0.52 mmol, 1.0 eq.) werden in 15 mL MeOH gelöst, mit 2.0 mL 2 M NaOH versetzt und 48 h bei 60°C gerührt. Zu dem Reaktionsgemisch werden 30 mL Wasser gegeben und die wässrige Phase mit Diethylether (3x 30 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wird mit 10% H₂SO₄ auf pH = 3 angesäuert und mit Ethylacetat (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingeengt und im HV getrocknet. Es werden 118 mg (0.46 mmol) **47** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 89%. **Schmp.:** 159°C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.77 (qt, 2 H, H-11, $^3J = 7.4$ Hz), 2.24 (m, 4 H, H-10, H-12), 3.79 (s, 3 H, H-7), 6.64 (d, 1 H, H-4, $^4J = 2.0$ Hz), 7.28 (d, 1 H, H-6, $^4J = 2.0$ Hz), 9.78 (s, 1 H, H-8), 12.10 (bs, 2 H, H-1, H-14). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 20.62 (C-11), 32.98 (C-12), 34.62 (C-10), 36.09 (C-7), 107.67 (C-4), 119.56 (C-3), 119.95 (C-6), 122.46 (C-5), 161.87 (C-2), 168.95 (C-13), 174.15 (C-9). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₁H₁₄N₂NaO₅]⁺: m/z 277.0795, gef.: m/z 277.0797; ber. für [C₁₁H₁₃N₂Na₂O₅]⁺: m/z 299.0614, gef.: m/z 299.0620; ber. für [C₁₁H₁₂N₂Na₃O₅]⁺: m/z 321.0434, gef.: m/z 321.0443; (ESI-neg., MeOH): ber. für [C₁₁H₁₃N₂O₅]⁻: m/z 253.0830, gef.: m/z 253.0821; ber. für [C₁₁H₁₂N₂NaO₅]⁻: m/z 275.0649, gef.: m/z 275.0649; ber. für [C₁₁H₁₁N₂Na₂O₅]⁻: m/z 297.0469, gef.: m/z 297.0473.

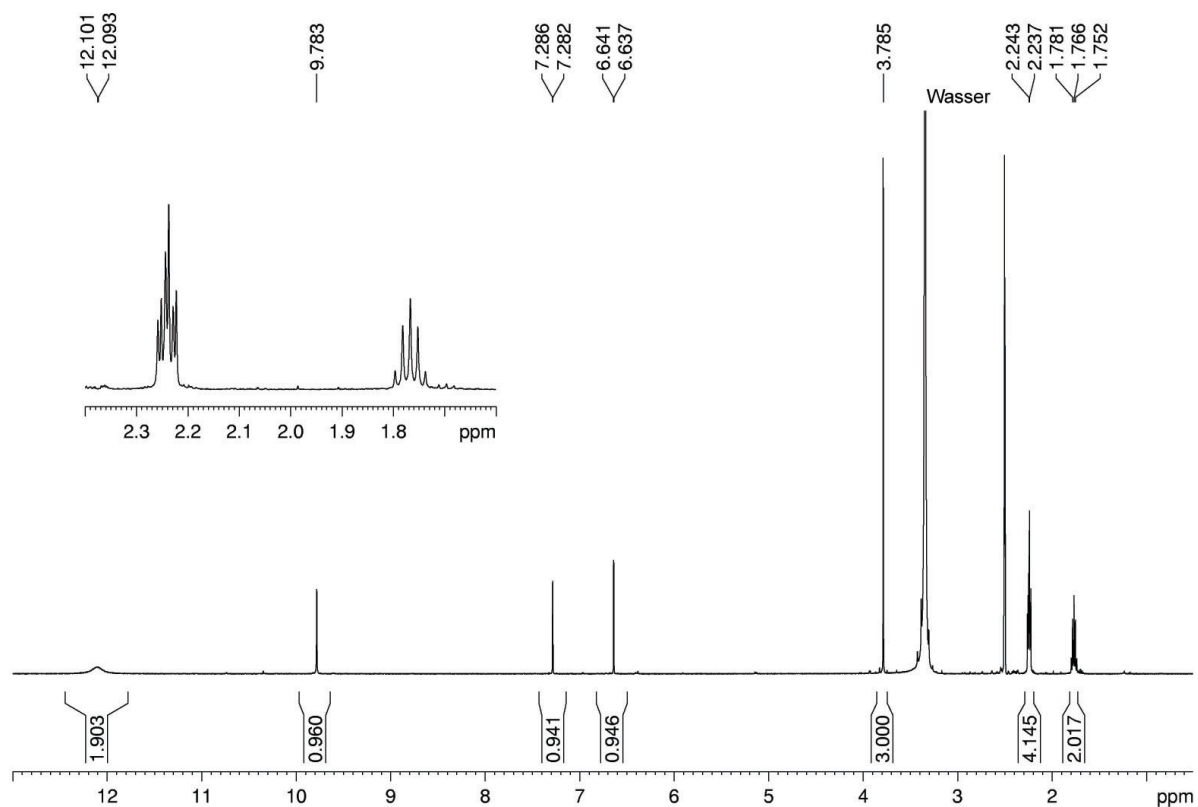
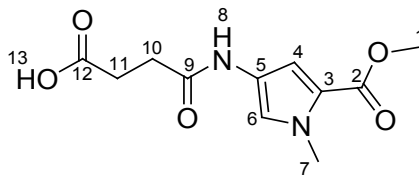


Abbildung 136: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆) von 47.

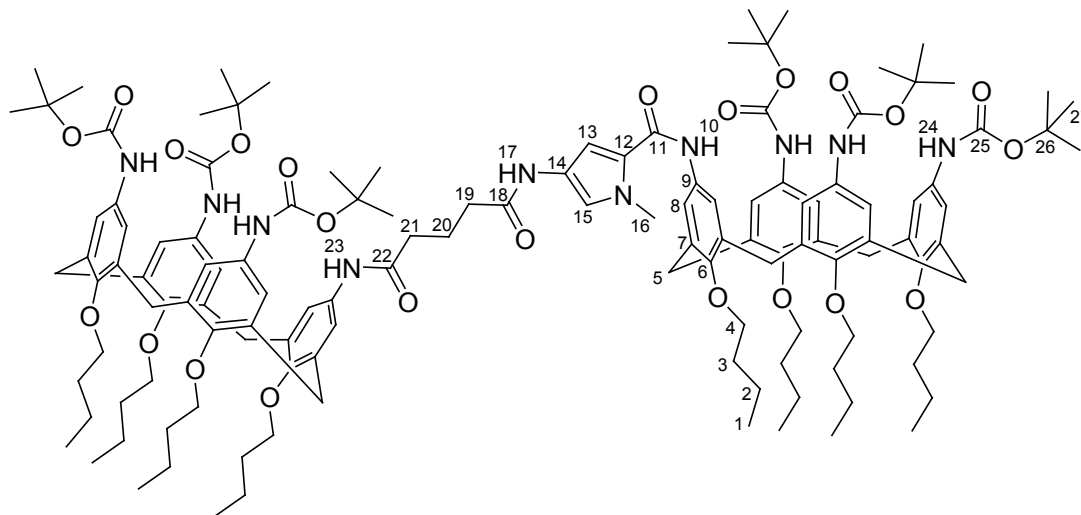
Darstellung von 4-(5-(Methoxycarbonyl)-1-methyl-1*H*-pyrrol-3-amino)-4-oxobuttersäure **44****Durchführung:**

50 mg Aminopyrrol **41** (0.26 mmol, 1.0 eq.) und 52 mg Bernsteinsäureanhydrid (0.52 mmol, 2.0 eq.) werden in 10 mL abs. DMF gelöst, mit 0.32 mL Triethylamin (2.34 mmol, 9.0 eq.) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit 30 mL Ethylacetat versetzt und mit 1 M HCl (2x 20 mL) und Wasser (3x 40 mL) extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingeeengt und im HV getrocknet. Es werden 7 mg (0.028 mmol) des hellbraunen Feststoffs **44** erhalten.

Ausbeute: 10%. **Schmp.:** 129-131°C. **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 2.49 (m, 4 H, H-10, H-11), 3.73 (s, 3 H, H-1), 3.81 (s, 3 H, H-7), 6.70 (d, 1 H, H-4, ⁴*J* = 2.0 Hz), 7.33 (d, 1 H, H-6, ⁴*J* = 1.9 Hz), 9.91 (s, 1 H, H-8), 12.14 (bs, 1 H, H-13). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₁H₁₆N₂O₅]⁺: *m/z* 255.0975, gef.: *m/z* 255.0989, (ESI-neg., MeOH): ber. für [C₁₁H₁₃N₂O₄]⁻: *m/z* 253.0819, gef.: *m/z* 253.0836.

5.3.8 Synthese der Calixaren-Dimere mit einer Pyrroleinheit

Darstellung von 4-(4-Carboxybutanamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-bis-[5,11,17-tris-[(*tert*-butoxycarbonyl)-amino]-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid] 54



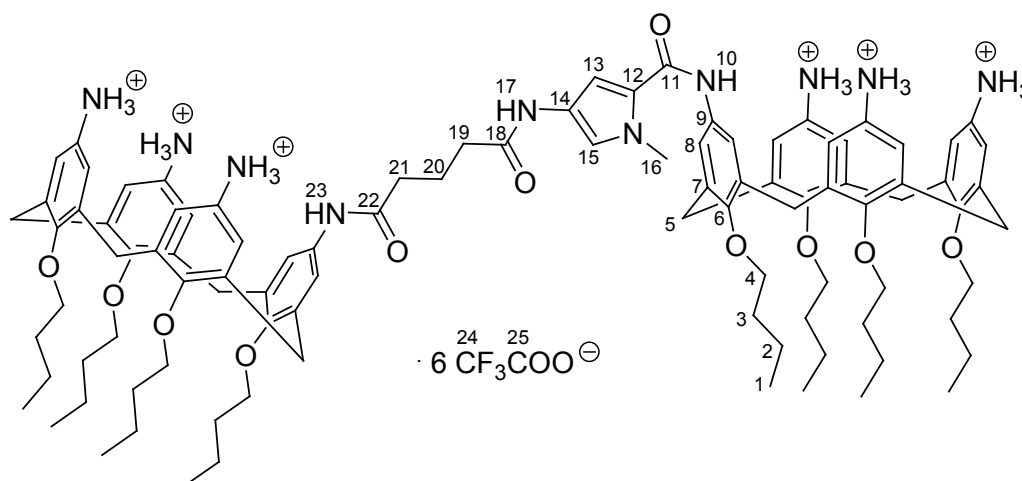
Durchführung:

158 mg Calixaren **13** (0.158 mmol, 2.0 eq.) werden in 15 mL abs. DMF/DCM (2:1) gelöst und nacheinander mit 61 mg EDCI (0.316 mmol, 4.0 eq.), 48 mg DMAP (0.395 mmol, 5.0 eq.) und 20 mg Säure **47** (0.079 mmol, 1.0 eq.) versetzt und 48 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit 20 mL DCM versetzt und mit Wasser (3x 15 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (KG 60, DCM/EA = 1:1) aufgereinigt und im HV getrocknet. Es werden 113 mg (0.051 mmol) des hellbraunen Feststoffs **54** erhalten.

Ausbeute: 64%. **Schmp.:** 165°C. **R_f:** 0.85 (DCM/EA = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 0.97 (m, 24 H, H-1), 1.37 (s, 18 H, H-27), 1.39 (m, 16 H, H-2), 1.43 (s, 36 H, H-27), 1.86 (m, 18 H, H-3, H-20), 2.20 (m, 4 H, H-19, H-21), 3.01 (m, 8 H, H-5), 3.70 (m, 8 H, H-4), 3.78 (s, 3 H, H-16), 3.82 (m, 8 H, H-4), 4.30 (m, 8 H, H-5), 6.54 (bs, 2 H, H-8), 6.69 (bs, 3 H, H-8), 6.77 (s, 3 H, H-8), 6.85 (s, 1 H, H-13), 6.95 (bs, 6 H, H-8), 7.13 (s, 2 H, H-8), 7.15 (s, 1 H, H-15), 8.51 (bs, 1 H, N-H), 8.71 (bs, 1 H, N-H), 8.78 (bs, 1 H, N-H), 8.90 (bs, 2 H, N-H), 9.25 (bs, 1 H, N-H), 9.28 (s, 1 H, H-23), 9.49 (s, 1 H, H-17), 9.72 (s, 1 H, H-10). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 13.93 (C-1), 18.76, 18.90 (C-2), 21.23 (C-20), 28.08, 28.13, 28.17 (C-27), 30.75 (C-5), 31.52, 31.71, 31.82 (C-3), 34.89 (C-19),

35.25 (C-21), 36.14 (C-16), 74.28, 74.56 (C-4), 78.19, 78.35 (C-26), 104.50 (C-13), 118.38 (C-15), 118.76, 119.19, 119.58, 120.87 (C-8), 121.93 (C-14), 122.79 (C-12), 132.88, 133.13, 133.18, 133.31, 133.39, 133.93, 134.02, 134.18, 134.72, 151.08, 151.22, 151.48, 151.55, 152.02, 152.79, 152.82, 152.87 (C_q), 159.41 (C-11), 168.99 (C-18), 169.91 (C_q). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₂₉H₁₇₈N₁₀NaO₂₃]⁺: *m/z* 2259.2991, gef.: *m/z* 2259.2970; ber. für [C₁₂₉H₁₇₈N₁₀Na₂O₂₃]²⁺: *m/z* 1141.1442, gef.: *m/z* 1141.1453.

Darstellung von 4-(4-Carboxybutanamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-bis-[5,11,17-triamino]-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid]-hexa-(trifluoracetat) **55**



Durchführung:

30 mg Calixaren-Dimer **54** (13.4 µmol) werden in 5.0 mL DCM gelöst, mit 5.0 mL TFA versetzt und 24 h bei RT gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels und Trocknung im HV wird das Produkt **55** als hellgelber Feststoff erhalten (31 mg, 13.3 µmol).

Ausbeute: quant. **Schmp.:** 208°C (Zers.). **¹H-NMR** (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 1.03 (m, 24 H, H-1), 1.42 (m, 8 H, H-2), 1.58 (m, 8 H, H-2), 1.93 (m, 18 H, H-3, H-20), 2.42 (bs, 4 H, H-19, H-21), 3.28 (m, 8 H, H-5), 3.88 (bs, 11 H, H-4, H-16), 3.99 (m, 4 H, H-4), 4.08 (m, 4 H, H-4), 4.51 (m, 8 H, H-5), 6.53 (bs, 2 H, H_{Ar}), 6.57 (bs, 2 H, H_{Ar}), 6.63 (bs, 4 H, H_{Ar}),

6.77 (s, 1 H, H_{Ar}), 6.90 (bs, 1 H, H_{Ar}), 6.95 (s, 2 H, H_{Ar}), 6.98 (s, 2 H, H_{Ar}), 7.08 (s, 1 H, H_{Ar}), 7.19 (s, 2 H, H_{Ar}), 7.23 (bs, 1 H, H_{Ar}). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 14.52, 14.62, 14.63, 14.68, 14.69 (C-1), 20.43, 20.45, 20.50, 20.52, 20.59, 20.76, 20.79 (C-2), 23.23 (C-20), 31.88, 32.02 (C-5), 33.39, 33.42, 33.54, 33.57, 33.72, 33.75 (C-3), 36.61 (C-19), 37.04 (C-16), 37.16 (C-21), 76.65, 76.69, 76.87, 76.91 (C-4), 106.86 (C-13), 115.06, 116.79, 117.32, 119.10 (C_q), 122.99, 123.30, 123.37, 123.43, 123.79, 123.85, 124.12, 124.41, 124.46 (C-8, C-15), 124.60, 126.29, 126.42, 134.28, 136.48, 136.63, 137.05, 137.13, 137.92, 137.95, 138.07, 138.63, 138.80, 154.86, 154.98, 157.54, 157.63, 158.05, 158.52, 158.60, 158.93, 159.26, 162.09, 162.38, 162.67, 162.96 (C_q), 172.76, 173.91 (C-18, C-22). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₉₉H₁₃₁N₁₀O₁₁]⁺: m/z 1637.0025, gef.: m/z 1637.0121; ber. für [C₉₉H₁₃₀N₁₀NaO₁₁]⁺: m/z 1658.9845, gef.: m/z 1658.9977.

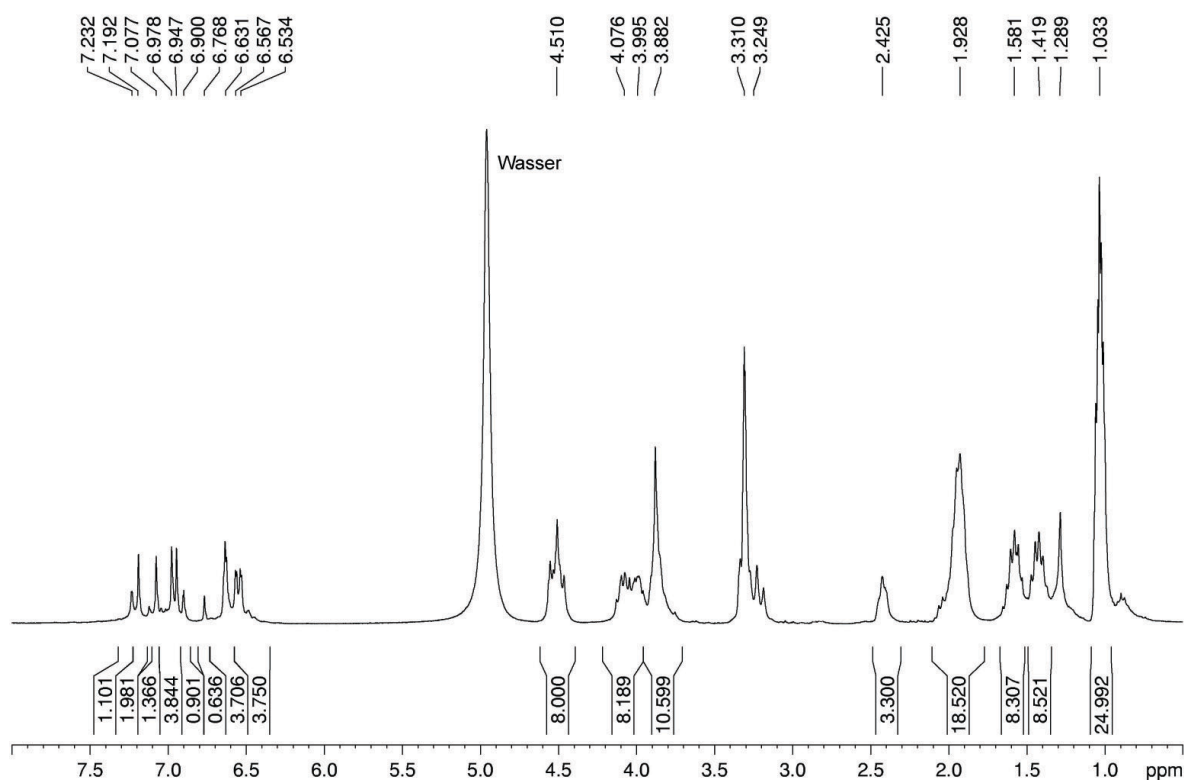
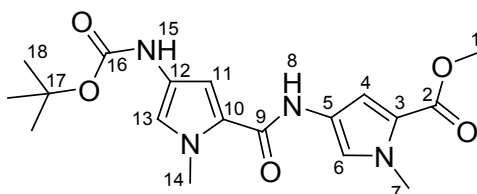


Abbildung 137: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, MeOH-*d*₄) von 55.

5.3.9 Synthese der Polypyrrolbausteine 48 bis 51

Darstellung von 4-(4-(*tert.*-Butoxycarbonylamino)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäuremethylester 48^[119]

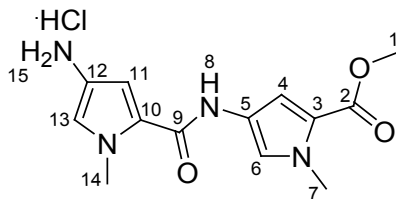


Durchführung:

1.00 g Aminopyrrol **41** (5.25 mmol, 1.0 eq.) werden in 80 mL abs. DMF gelöst. Nacheinander werden 2.01 g EDCI (10.50 mmol, 2.0 eq.), 1.60 g DMAP (13.13 mmol, 2.5 eq.) und 1.26 g Pyrrol-Säure **42** (5.25 mmol, 1.0 eq.) hinzugegeben und die Lösung 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 100 mL Ethylacetat versetzt und mit 10% HCl (3x 60 mL) und ges. wässriger NaHCO₃ (3x 60 mL) extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingengt und im HV getrocknet. Es werden 1.51 g (4.01 mmol) des Produkts **48** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 76%. **Schmp.:** 89-91°C. **R_f:** 0.2 (CH/EA = 3:1). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.45 (s, 9 H, H-18), 3.73 (s, 3 H, H-1), 3.80 (s, 3 H, H-14), 3.83 (s, 3 H, H-7), 6.83 (s, 1 H, H-11), 6.88 (s, 1 H, H-13), 6.89 (d, 1 H, H-4, ⁴*J* = 1.7 Hz), 7.44 (d, 1 H, H-6, ⁴*J* = 1.9 Hz), 9.10 (s, 1 H, H-15), 9.85 (s, 1 H, H-8). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 28.19 (C-18), 36.02 (C-7), 36.14 (C-14), 50.92 (C-1), 78.30 (C-17), 103.78 (C-11), 108.33 (C-4), 117.13 (C-13), 118.46 (C-3), 120.71 (C-6), 122.39 (C-12), 122.56 (C-10), 122.95 (C-5), 152.83 (C-16), 158.39 (C-9), 160.79 (C-2). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₈H₂₅N₄O₅]⁺: *m/z* 377.1819, gef.: *m/z* 377.1845; ber. für [C₁₈H₂₄N₄NaO₅]⁺: *m/z* 399.1639, gef.: *m/z* 399.1665.

Darstellung von 4-(4-Amino-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid **49^[119]**

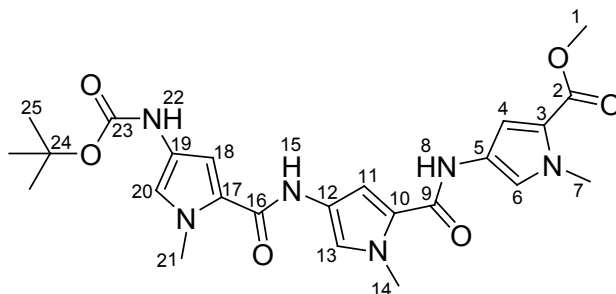


Durchführung:

1.23 g Boc-Dimer **48** (3.27 mmol, 1.0 eq.) werden in 40 mL Ethylacetat gelöst, mit 40 mL 4 M HCl versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Lösung wird eingeeengt und das Rohprodukt in Wasser aufgenommen, mit Diethylether gewaschen und die wässrige Phase durch Gefrier-trocknung eingeeengt. Es werden 0.99 g (3.17 mmol) **49** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 97%. **Schmp.:** 245-249°C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.74 (s, 3 H, H-1), 3.84 (s, 3 H, H-7), 3.88 (s, 3 H, H-14), 6.90 (d, 1 H, H-4, $^4J = 2.0$ Hz), 6.96 (d, 1 H, H-11, $^4J = 2.0$ Hz), 7.11 (d, 1 H, H-13, $^4J = 2.0$ Hz), 7.45 (d, 1 H, H-6, $^4J = 2.0$ Hz), 9.90 (bs, 3 H, H-15), 10.07 (s, 1 H, H-8). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 36.21 (C-7), 36.59 (C-14), 51.01 (C-1), 107.11 (C-11), 108.40 (C-4), 112.96 (C-12), 118.69 (C-3), 120.85 (C-6), 121.74 (C-13), 122.49 (C-5), 124.73 (C-10), 157.67 (C-9), 160.77 (C-2). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₃H₁₇N₄O₃]⁺: m/z 277.1295, gef.: m/z 277.1294; ber. für [C₁₃H₁₆N₄NaO₃]⁺: m/z 299.1115, gef.: m/z 299.1114.

Darstellung von 4-(4-(4-(*tert.*-Butoxycarbonylamino)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäuremethylester **50^[119]**

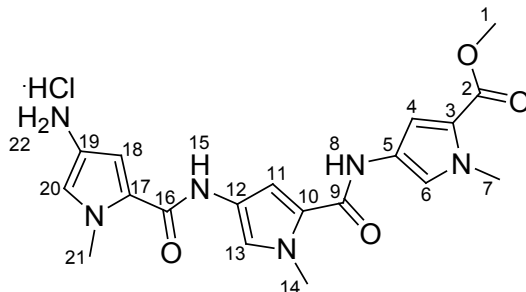


Durchführung:

0.992 g Dipyrrol-Amin **49** (3.17 mmol, 1.0 eq.) werden in 60 mL abs. DMF gelöst. Nacheinander werden 1.220 g EDCI (6.34 mmol, 2.0 eq.), 0.970 g DMAP (7.93 mmol, 2.5 eq.) und 0.761 g Pyrrol-Säure **42** (3.17 mmol, 1.0 eq.) hinzugegeben und die Lösung 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 100 mL Ethylacetat versetzt und mit 10% HCl (3x 60 mL) und ges. wässriger NaHCO₃ (3x 60 mL) extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingengt und im HV getrocknet. Es werden 1.261 g (2.53 mmol) **50** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 80%. **Schmp.:** 68-73°C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.45 (s, 9 H, H-25), 3.74 (s, 3 H, H-1), 3.81 (s, 3 H, H-21), 3.84 (s, 6 H, H-7, H-14), 6.83 (s, 1 H, H-18), 6.89 (s, 1 H, H-20), 6.90 (d, 1 H, H-4, ⁴*J* = 2.3 Hz), 7.06 (d, 1 H, H-11, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.21 (d, 1 H, H-13, ⁴*J* = 1.7 Hz), 7.46 (d, 1 H, H-6, ⁴*J* = 2.1 Hz), 9.09 (s, 1 H, H-22), 9.86 (s, 1 H, H-15), 9.92 (s, 1 H, H-8). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 28.22 (C-25), 35.79 (C-21), 36.05 (C-14), 36.18 (C-7), 50.95 (C-1), 78.31 (C-24), 103.83 (C-18), 104.82 (C-11), 108.37 (C-4), 117.09 (C-20), 118.51 (C-13), 120.75 (C-6), 122.30 (C-19), 122.33 (C-19), 122.50 (C-10), 122.80 (C-17), 122.99 (C-5), 152.88 (C-23), 158.44 (C-16), 158.51 (C-9), 160.82 (C-2). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₂₄H₃₁N₆O₆]⁺: *m/z* 499.2300, gef.: *m/z* 499.2320; ber. für [C₂₄H₃₀N₆NaO₆]⁺: *m/z* 521.2119, gef.: *m/z* 521.2133; (ESI-neg., MeOH): ber. für [C₂₄H₂₉N₆O₆]⁻: *m/z* 497.2154, gef.: *m/z* 497.2157.

Darstellung von 4-(4-(4-Amino-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäuremethylester-hydrochlorid **51^[119]**

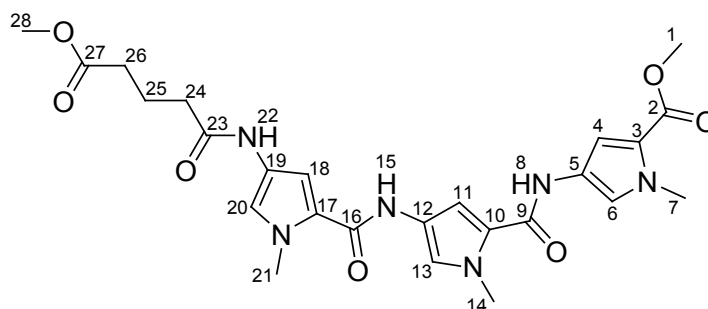


Durchführung:

1.26 g Boc-Trimer **50** (2.53 mmol, 1.0 eq.) werden in 35 mL Ethylacetat gelöst, mit 35 mL 4 M HCl versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Lösung wird eingeeengt und das Rohprodukt in Wasser aufgenommen und mit Diethylether gewaschen. Nach Gefriertrocknung der wässrigen Phase werden 1.10 g (2.53 mmol) des Produkts **51** in Form eines hellbraunen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: quant.. **Schmp.:** 212-218°C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.73 (s, 3 H, H-1), 3.84 (s, 3 H, H-7), 3.85 (s, 3 H, H-14), 3.90 (s, 3 H, H-21), 6.90 (d, 1 H, H-4, $^4J = 2.0$ Hz), 6.99 (d, 1 H, H-18, $^4J = 2.0$ Hz), 7.07 (d, 1 H, H-11, $^4J = 1.9$ Hz), 7.12 (d, 1 H, H-20, $^4J = 2.0$ Hz), 7.25 (d, 1 H, H-13, $^4J = 1.9$ Hz), 7.47 (d, 1 H, H-6, $^4J = 2.0$ Hz), 9.92 (bs, 3 H, H-22), 9.95 (s, 1 H, H-8), 10.08 (s, 1 H, H-15). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 36.10 (C-7), 36.17 (C-14), 36.59 (C-21), 50.94 (C-1), 104.79 (C-11), 107.16 (C-18), 108.36 (C-4), 113.00 (C-19), 118.49 (C-3), 118.69 (C-13), 120.75 (C-6), 121.59 (C-20), 121.86 (C-12), 122.61 (C-10), 122.95 (C-5), 124.82 (C-17), 157.69 (C-16), 158.42 (C-9), 160.80 (C-2). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₉H₂₃N₆O₄]⁺: m/z 399.1775, gef.: m/z 399.1776; ber. für [C₁₉H₂₂N₆NaO₄]⁺: m/z 421.1595, gef.: m/z 421.1595.

Darstellung von 4-(4-(4-(5-Methoxy-5-oxopentanamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäuremethylester **52**

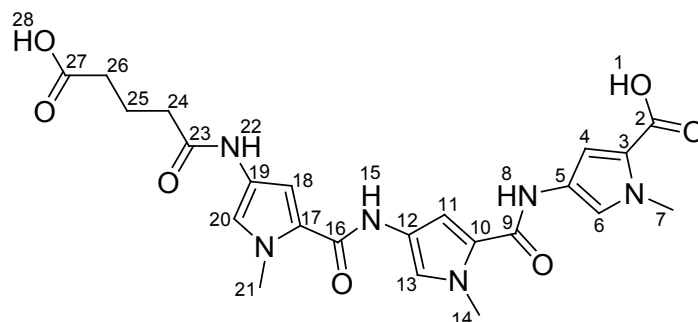


Durchführung:

0.113 g Tripyrrol-Amin **51** (0.260 mmol, 1.0 eq.) werden in 30 mL abs. DCM/DMF (2:1) gelöst, mit 36 µL Glutarsäuremonomethylesterchlorid **45** (0.260 mmol, 1.0 eq.), 86 µL DIEA (0.520 mmol, 2.0 eq.) und einer katalytischen Menge DMAP versetzt und 24 h bei RT gerührt. Zur Reaktionsmischung werden 10 mL DCM gegeben und die Lösung mit 0.5 M HCl (3x 40 mL) und Wasser (3x 40 mL) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingengt und im HV getrocknet. Es werden 0.112 g (0.212 mmol) **52** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 82%. **Schmp.:** 188°C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.82 (m, 2 H, H-25), 2.28 (m, 2 H, H-24), 2.35 (m, 2 H, H-26), 3.60 (s, 3 H, H-28), 3.74 (s, 3 H, H-1), 3.83 (s, 3 H, H-7), 3.84 (s, 6 H, H-14, H-21), 6.87 (d, 1 H, H-4, ⁴*J* = 1.7 Hz), 6.91 (d, 1 H, H-18, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.06 (d, 1 H, H-11, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.16 (d, 1 H, H-20, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.23 (d, 1 H, H-13, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.47 (d, 1 H, H-6, ⁴*J* = 1.9 Hz), 9.81 (s, 1 H, H-22), 9.90 (s, 1 H, H-8), 9.93 (s, 1 H, H-15). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 20.65 (C-25), 32.65 (C-24), 34.49 (C-26), 36.06 (C-7), 36.08 (C-14), 36.16 (C-21), 50.92 (C-1), 51.26 (C-27), 103.97 (C-18), 104.77 (C-11), 108.35 (C-4), 118.17 (C-20), 118.50 (C-3), 118.58 (C-13), 120.74 (C-6), 121.96 (C-19), 122.22 (C-12), 122.49 (C-10), 122.69 (C-5), 122.98 (C-17), 158.40 (C-16), 158.47 (C-9), 160.80 (C-2), 168.83 (C-23), 173.22 (C-27). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₂₅H₃₁N₆O₇]⁺: *m/z* 527.2249, gef.: *m/z* 527.2259; ber. für [C₂₅H₃₀N₆NaO₇]⁺: *m/z* 549.2068, gef.: *m/z* 549.2065.

Darstellung von 4-(4-(4-(4-Carboxybutanamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure **53**



Durchführung:

153 mg Diester **52** (0.290 mmol, 1.0 eq.) werden in 20 mL MeOH gelöst, mit 2.1 mL 2 M NaOH versetzt und 48 h bei 60°C gerührt. Zu dem Reaktionsgemisch werden 40 mL Wasser gegeben und die wässrige Phase mit Diethylether (2x 30 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wird mit 10% H₂SO₄ auf pH = 3 angesäuert und mit Ethylacetat (3x 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingengt, mit einer geringen Menge Wasser versetzt und gefriergetrocknet. Das Produkt **53** wird als hellbrauner Feststoff erhalten (96 mg, 0.193 mmol).

Ausbeute: 66%. **Schmp.:** 120°C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.79 (t, 2 H, H-25, ³*J* = 7.3 Hz), 2.25 (m, 4 H, H-24, H-26), 3.82 (s, 3 H, H-7), 3.83 (s, 3 H, H-14), 3.84 (s, 3 H, H-21), 6.85 (d, 1 H, H-4, ⁴*J* = 2.0 Hz), 6.87 (d, 1 H, H-18, ⁴*J* = 1.7 Hz), 7.05 (d, 1 H, H-11, ⁴*J* = 1.7 Hz), 7.16 (d, 1 H, H-20, ⁴*J* = 1.7 Hz), 7.23 (d, 1 H, H-13, ⁴*J* = 1.7 Hz), 7.43 (d, 1 H, H-6, ⁴*J* = 1.9 Hz), 9.80 (s, 1 H, H-22), 9.89 (s, 1 H, H-8), 9.90 (s, 1 H, H-15), 12.10 (bs, 2 H, H-1, H-28). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 20.76 (C-25), 33.00 (C-24), 34.65 (C-26), 36.06 (C-7), 36.08 (C-14), 36.12 (C-21), 103.97 (C-18), 104.72 (C-11), 108.38 (C-4), 118.16 (C-20), 118.52 (C-13), 119.48 (C-3), 120.27 (C-6), 121.99 (C-19), 122.19 (C-12), 122.57 (C-5), 122.69 (C-10, C-17), 158.41 (C-16), 158.43 (C-9), 161.95 (C-2), 168.98 (C-23), 174.17 (C-27). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₂₃H₂₇N₆O₇]⁺: *m/z* 499.1936, gef.: *m/z* 499.1915; ber. für [C₂₃H₂₆N₆NaO₇]⁺: *m/z* 521.1755, gef.: *m/z* 521.1765; (ESI-neg., MeOH): ber. für [C₂₃H₂₅N₆O₇]⁻: *m/z* 497.1790, gef.: *m/z* 497.1769.

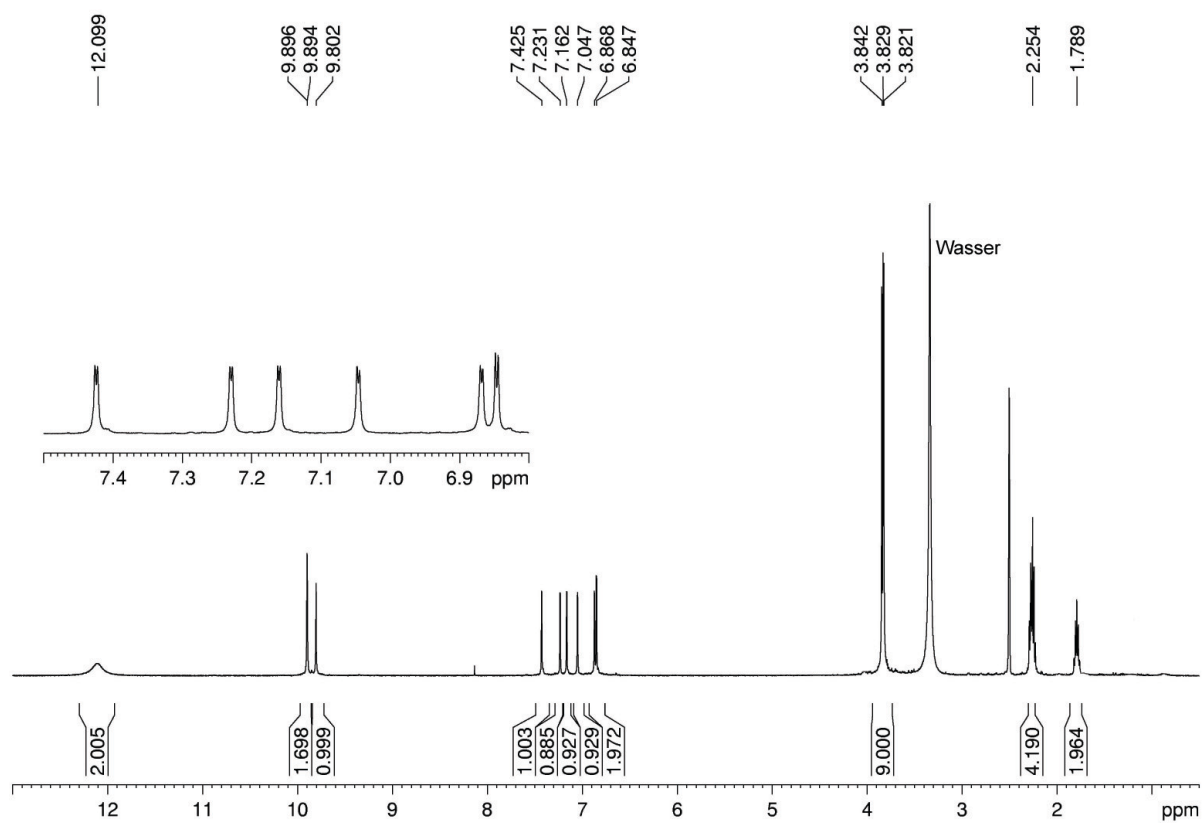
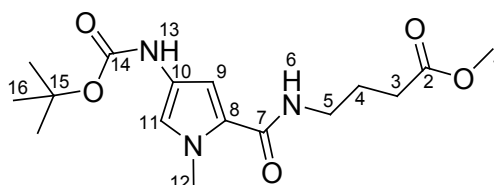


Abbildung 138: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d_6) von 53.

5.3.10 Synthese der Pyrrolbausteine 57 bis 59

Darstellung von 4-(4-(*tert.*-Butoxycarbonylamino)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-buttersäuremethylester 57



Durchführung:

31 mg γ -Aminobuttersäuremonomethylester **56** (0.20 mmol, 1.0 eq.) werden in 10 mL abs. DMF gelöst, mit 76 mg EDCI (0.40 mmol, 2.0 eq.), 61 mg DMAP (0.50 mmol, 2.5 eq.) und 48 mg Pyrrolsäure **42** (0.20 mmol, 1.0 eq.) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Zur Reaktionslösung werden 20 mL Ethylacetat hinzugefügt und diese nacheinander mit 10% HCl (2x 20 mL) und ges. NaHCO₃ (2x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingengt und im HV getrocknet. Es werden 51 mg (0.15 mmol) des Produkts **57** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 75%. **Schmp.:** 160-163°C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.44 (s, 9 H, H-16), 1.72 (qt, 2 H, H-4, ³*J* = 7.1 Hz), 2.32 (t, 2 H, H-3, ³*J* = 7.4 Hz), 3.15 (q, 2 H, H-5, ³*J* = 6.0 Hz), 3.58 (s, 3 H, H-1), 3.74 (s, 3 H, H-12), 6.62 (s, 1 H, H-9), 6.81 (s, 1 H, H-11), 7.96 (t, 1 H, H-6, ³*J* = 5.6 Hz), 9.02 (s, 1 H, H-13). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 24.65 (C-4), 28.18 (C-16), 30.80 (C-3), 35.84 (C-5), 37.66 (C-12), 51.21 (C-1), 78.20 (C-15), 103.23 (C-9), 116.31 (C-11), 122.19 (C-10), 122.94 (C-8), 152.79 (C-14), 161.20 (C-9), 173.16 (C-2). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₆H₂₅N₃NaO₅]⁺: *m/z* 362.1697, gef.: *m/z* 362.1571, (ESI-neg., MeOH): ber. für [C₁₆H₂₄N₃O₅]⁻: *m/z* 338.1721, gef.: *m/z* 338.1702.

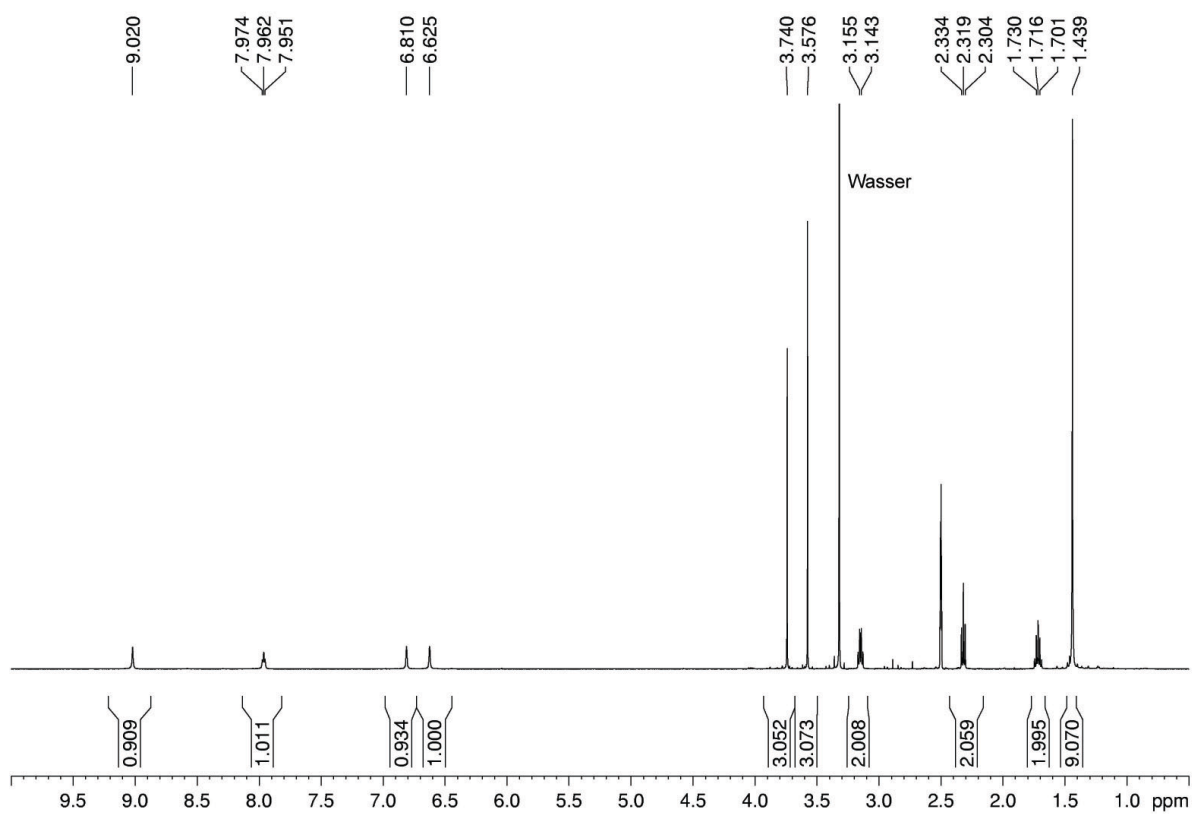
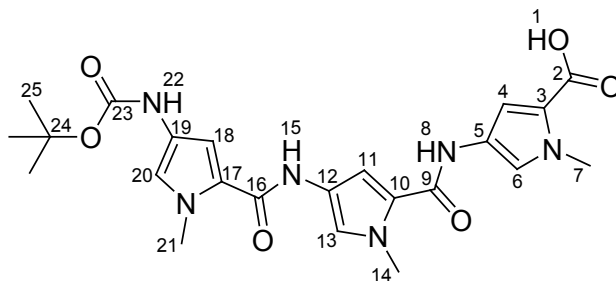


Abbildung 139: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d₆) von 57.

Darstellung von 4-(4-(4-(*tert.*-Butoxycarbonylamino)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure **58**



Durchführung:

0.25 g Tripyrrol **50** (0.50 mmol, 1.0 eq.) werden in 35 mL MeOH gelöst, mit 3.5 mL 2 M NaOH versetzt und 48 h bei 60°C gerührt. Die Reaktionslösung wird abgekühlt, mit 20 mL Wasser versetzt und mit Diethylether (2x 20 mL) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird mit 10% H₂SO₄ auf pH = 3 eingestellt und mit Ethylacetat (3x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingengt und im HV getrocknet, um 182 mg (0.38 mmol) des Produkts **58** in Form eines hellbraunen Feststoffs zu erhalten.

Ausbeute: 75%. **Schmp.:** 150°C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.46 (s, 9 H, H-25), 3.81 (s, 3 H, H-21), 3.82 (s, 3 H, H-14), 3.84 (s, 3 H, H-7), 6.83 (d, 1 H, H-18, ⁴*J* = 1.9 Hz), 6.84 (d, 1 H, H-4, ⁴*J* = 2.0 Hz), 6.89 (s, 1 H, H-11), 7.05 (d, 1 H, H-11, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.21 (d, 1 H, H-13, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.42 (d, 1 H, H-6, ⁴*J* = 2.0 Hz), 9.09 (s, 1 H, H-22), 9.86 (s, 1 H, H-15), 9.88 (s, 1 H, H-8), 12.12 (bs, 1 H, H-1). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 28.20 (C-25), 36.03 (C-21), 36.11 (C-7, C-14), 78.45 (C-24), 103.81 (C-18), 104.74 (C-11), 108.36 (C-4), 118.41 (C-20), 119.46 (C-3, C-13), 120.24 (C-6), 122.30 (C-12, C-19), 122.53 (C-10, C-17), 122.68 (C-5), 152.10 (C-23), 158.40 (C-9, C-16), 161.93 (C-2). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₂₃H₂₈N₆NaO₆]⁺: *m/z* 507.1963, gef.: *m/z* 507.1990, (ESI-neg., MeOH): ber. für [C₂₃H₂₇N₆O₆]⁻: *m/z* 483.1998, gef.: *m/z* 483.1996.

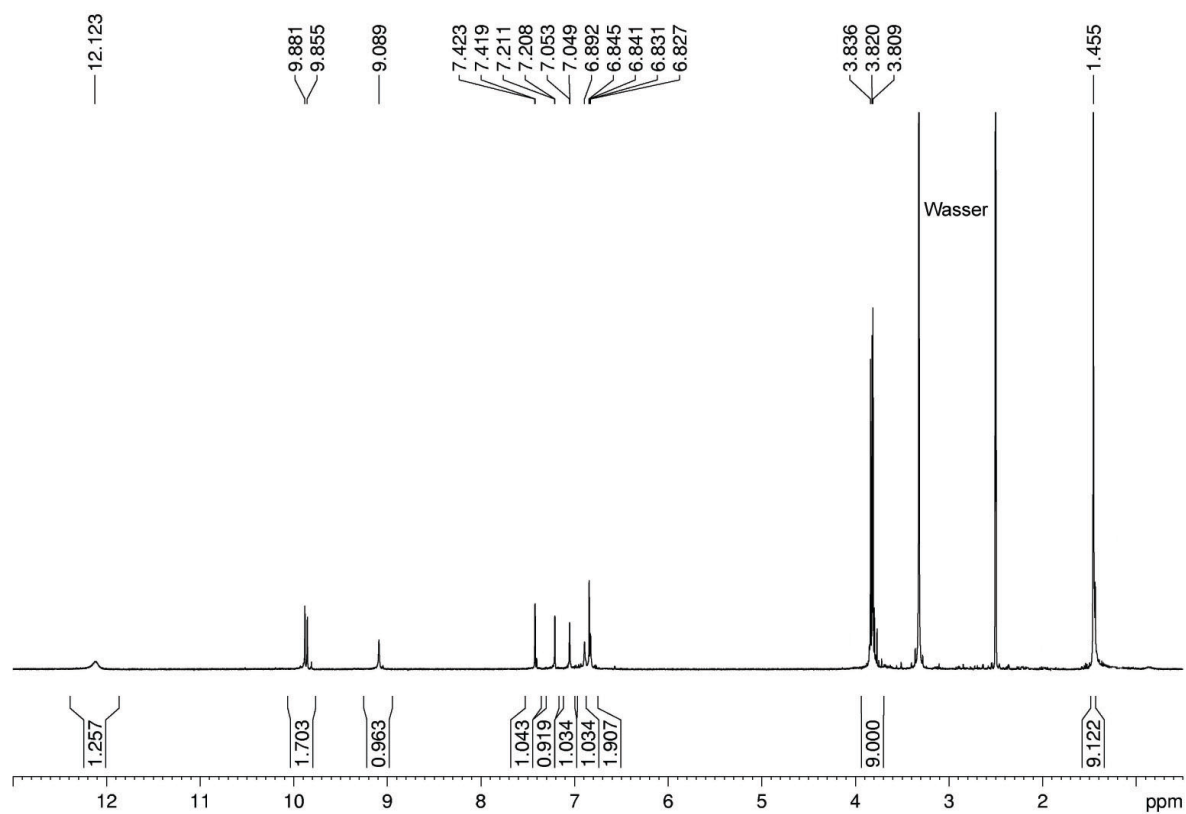
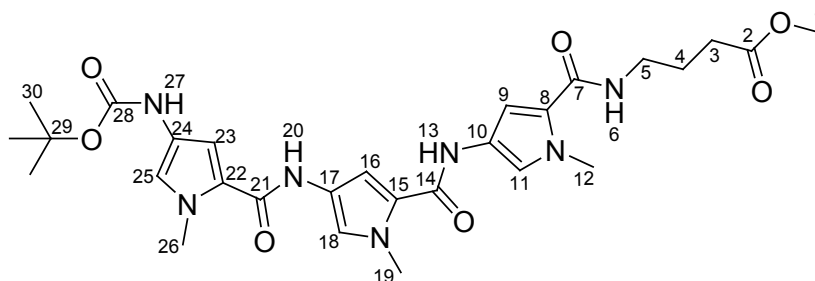


Abbildung 140: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆) von **58**.

Darstellung von 4-(4-(4-(4-(*tert.*-Butoxycarbonylamino)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-buttersäuremethylester **59**



Durchführung:

41 mg γ -Aminobuttersäuremonomethylester **56** (0.268 mmol, 1.0 eq.) werden in 30 mL abs. DMF gelöst, mit 103 mg EDCI (0.536 mmol, 2.0 eq.), 82 mg DMAP (0.670 mmol, 2.5 eq.) und 130 mg Pyrrolsäure **58** (0.268 mmol, 1.0 eq.) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Zur Reaktionslösung werden 40 mL Ethylacetat hinzugefügt und diese nacheinander mit 10% HCl (2x 30 mL) und ges. NaHCO₃ (2x 30 mL) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingeeengt und säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt. Nach Trocknung im HV werden 107 mg (0.183 mmol) des Produkts **59** in Form eines hellbraunen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 68%. **Schmp.:** 115-117°C. **R_f:** 0.60 (EA). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.46 (s, 9 H, H-30), 1.74 (qt, 2 H, H-4, ³*J* = 7.2 Hz), 2.34 (t, 2 H, H-3, ³*J* = 7.5 Hz), 3.18 (q, 2 H, H-5, ³*J* = 6.1 Hz), 3.59 (s, 3 H, H-1), 3.79, 3.81, 3.84 (3 s, je 3 H, H-12, H-19, H-26), 6.84 (bs, 1 H, H-23), 6.87 (d, 1 H, H-9, ⁴*J* = 1.9 Hz), 6.89 (bs, 1 H, H-25), 7.03 (d, 1 H, H-16, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.18 (d, 1 H, H-11, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.22 (d, 1 H, H-18, ⁴*J* = 1.8 Hz), 8.03 (t, 1 H, H-6, ³*J* = 5.7 Hz), 9.09 (s, 1 H, H-27), 9.86 (s, 1 H, H-20), 9.87 (s, 1 H, H-13). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 24.68 (C-4), 28.21 (C-30), 30.81 (C-3), 35.91, 36.03, 36.05 (C-12, C-19, C-26), 37.70 (C-5), 51.24 (C-1), 78.29 (C-29), 103.82 (C-23), 104.20 (C-9), 104.69 (C-16), 117.03 (C-25), 117.79 (C-11), 118.36 (C-18), 122.13, 122.18, 122.31, 122.74, 122.83, 122.88 (C-8, C-10, C-15, C-17, C-22, C-24), 152.86 (C-28), 158.43, 158.47 (C-14, C-21), 161.32 (C-7), 173.19 (C-2). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₂₈H₃₇N₇NaO₇]⁺: *m/z* 606.2647, gef.: *m/z* 606.2696.

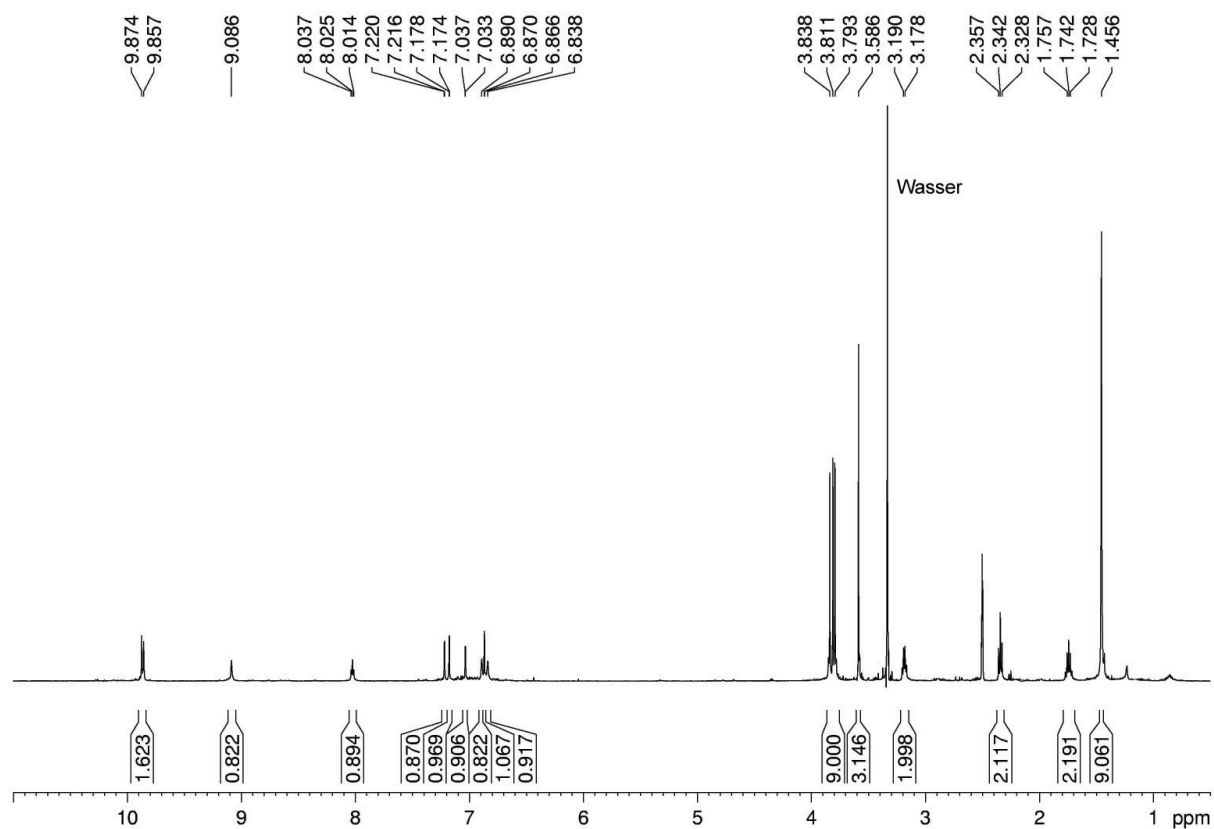
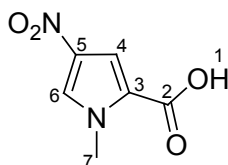


Abbildung 141: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d₆) von 59.

5.3.11 Synthese der monofunktionalisierten Calixarenhalbschalen

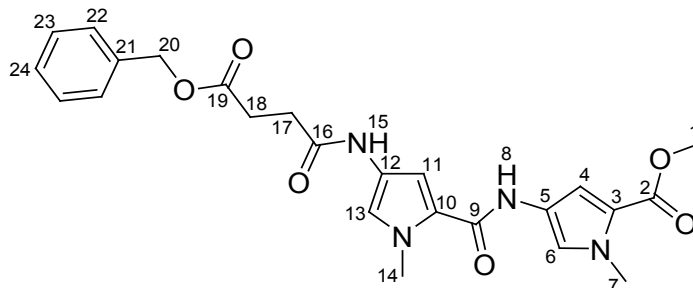
Darstellung von 1-Methyl-4-nitro-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure **64**



Durchführung:

1.0 g Nitropyrrolester **40** (5.43 mmol, 1.0 eq.) werden in 100 mL MeOH gelöst, mit 7 mL 2 M NaOH versetzt und 48 h bei 60°C gerührt. Die abgekühlte Lösung wird mit 100 mL Wasser versetzt, mit Diethylether (3x 100 mL) ausgeschüttelt und die wässrige Phase mit 10%iger H₂SO₄ auf pH = 3 eingestellt. Diese wird mit Ethylacetat (3x 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingeeengt und im HV getrocknet. Es werden 0.83 g (4.88 mmol) eines weißen Feststoffes erhalten.

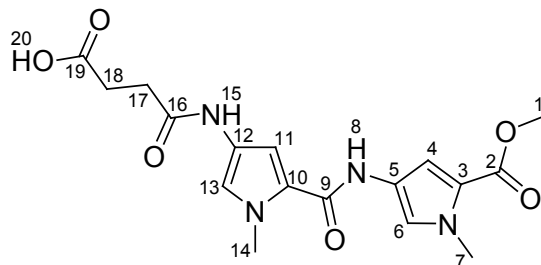
Ausbeute: 90%. **Schmp.:** 180°C (Zers.). **R_f:** 0.0 (EA). **R_f:** 0.8 (Edukt in EA). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.91 (s, 3 H, H-7), 7.25 (d, 1 H, H-4, ⁴*J* = 1.7 Hz), 8.22 (d, 1 H, H-6, ⁴*J* = 1.7 Hz). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 37.48 (C-7), 111.39 (C-4), 123.78 (C-3), 129.18 (C-6), 134.00 (C-5), 160.97 (C-2). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₆H₇N₂O₄]⁺: *m/z* 171.0400, gef.: *m/z* 171.0033.

Darstellung von 4-(4-(4-(Benzyloxy)-4-oxobutanamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbox-amido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäuremethylester **66****Durchführung:**

200 mg Aminodipyrrol **49** (0.64 mmol, 1.0 eq.) werden in 30 mL abs. DCM/abs. DMF (1:1) gelöst, mit 245 mg EDCI (1.28 mmol, 2.0 eq.), 195 mg DMAP (1.60 mmol, 2.5 eq.) und 133 mg 4-(Benzyloxy)-4-oxobuttersäure **65** (0.64 mmol, 1.0 eq.) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit 40 mL Ethylacetat versetzt und die organische Phase mit 10%iger HCl (3x 40 mL) und ges. NaHCO₃-Lösung (3x 40 mL) gewaschen, getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingeeengt und im HV getrocknet. Es werden 284 mg (0.61 mmol) des Produkts **66** als braunes Öl erhalten.

Ausbeute: 95%. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 2.56 (m, 2 H, H-18), 2.65 (m, 2 H, H-17), 3.73 (s, 3 H, H-1), 3.82 (s, 3 H, H-7), 3.83 (s, 3 H, H-14), 5.09 (s, 2 H, H-20), 6.88 (d, 1 H, H-4, ⁴*J* = 1.9 Hz), 6.89 (d, 1 H, H-11, ⁴*J* = 2.0 Hz), 7.13 (d, 1 H, H-13, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.33-7.36 (m, 5 H, H-22, H-23, H-24), 7.45 (d, 1 H, H-6, ⁴*J* = 1.9 Hz), 9.88 (s, 1 H, H-8), 9.90 (s, 1 H, H-15). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 28.97 (C-17), 30.07 (C-18), 36.06 (C-7), 36.15 (C-14), 50.93 (C-1), 65.42 (C-20), 103.96 (C-11), 108.34 (C-4), 118.17 (C-13), 118.50 (C-3), 120.74 (C-6), 122.04 (C-12), 122.47 (C-5), 122.88 (C-10), 127.80 (C-22), 127.92 (C-24), 128.39 (C-23), 136.20 (C-21), 158.37 (C-9), 160.78 (C-2), 167.99 (C-16), 172.25 (C-19). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₂₄H₂₇N₄O₆]⁺: *m/z* 467.1925, gef.: *m/z* 467.1935, ber. für [C₂₄H₂₆N₄NaO₆]⁺: *m/z* 489.1745, gef.: *m/z* 489.1752.

Darstellung von 4-(5-(5-(Methoxycarbonyl)-1-methyl-1*H*-pyrrol-3-ylcarbamoyl)-1-methyl-1*H*-pyrrol-3-ylamino)-4-oxobuttersäure **67**



Durchführung:

260 mg **66** (0.56 mmol) werden in 40 mL Ethylacetat gelöst, mit 30 mg Pd/C versetzt und 48 h bei 45°C hydriert. Die Lösung wird über Celite filtriert, mit Ethylacetat (3x 20 mL) nachgewaschen, eingengt und im HV getrocknet. Es werden 195 mg (0.42 mmol) **67** in Form eines hellbraunen Öls erhalten.

Ausbeute: 75%. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 2.36 (m, 2 H, H-17), 2.41 (m, 2 H, H-18), 3.73 (s, 3 H, H-1), 3.81 (s, 3 H, H-7), 3.83 (s, 3 H, H-14), 6.86 (s, 1 H, H-4), 6.89 (d, 1 H, H-11, ⁴*J* = 1.9 Hz), 7.13 (d, 1 H, H-13, ⁴*J* = 1.6 Hz), 7.44 (d, 1 H, H-6, ⁴*J* = 1.8 Hz), 9.90 (s, 1 H, H-8), 10.33 (s, 1 H, H-15). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 31.57 (C-18), 31.99 (C-17), 36.06 (C-7), 36.19 (C-14), 50.97 (C-1), 104.04 (C-11), 108.40 (C-4), 118.21 (C-13), 118.54 (C-3), 120.77 (C-6), 122.36 (C-12), 122.42 (C-5), 122.97 (C-10), 158.48 (C-9), 160.85 (C-2), 169.51 (C-16), 174.94 (C-19). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₇H₂₀N₄NaO₆]⁺: *m/z* 399.1275, gef.: *m/z* 399.1297.

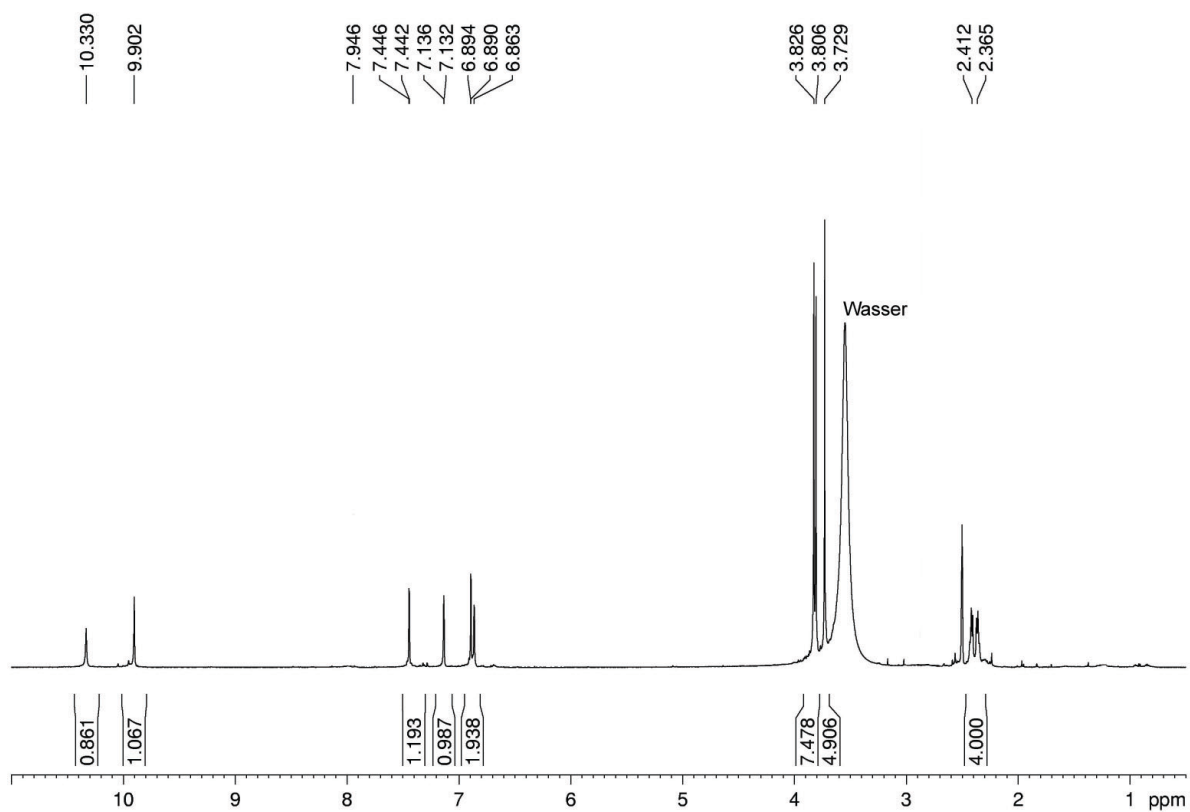
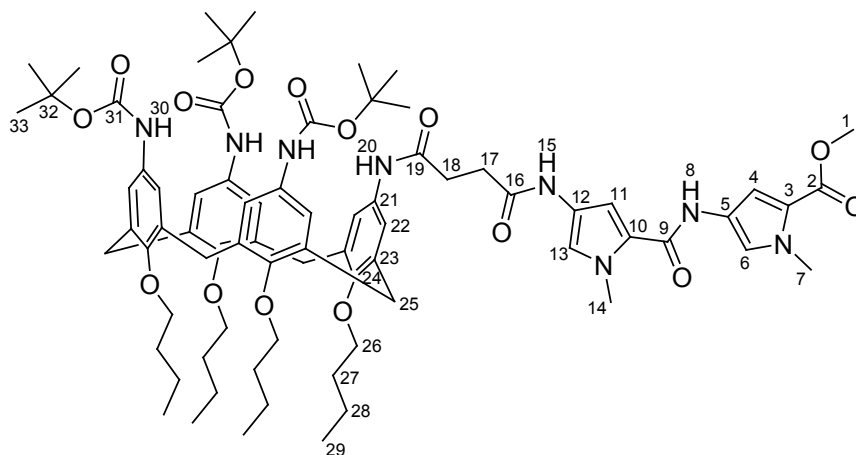


Abbildung 142: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d₆) von 67.

Darstellung von 4-(5-(5-(Methoxycarbonyl)-1-methyl-1*H*-pyrrol-3-ylcarbamoyl)-1-methyl-1*H*-pyrrol-3-ylamino)-4-oxobuttersäure-[5,11,17-tris-[(*tert*.-butoxycarbonyl)-amino]-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid] 68



Durchführung:

496 mg Calixaren **13** (0.492 mmol, 1.0 eq.) werden in 50 mL abs. DCM/abs. DMF (1:1) gelöst, mit 187 mg EDCI (0.984 mmol, 2.0 eq.), 150 mg DMAP (1.230 mmol, 2.5 eq.) und 185 mg **67** (0.492 mmol, 1.0 eq.) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit 40 mL DCM versetzt und mit Wasser (3x 30 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, EA/CH = 3:1) gereinigt und im HV getrocknet. Es werden 436 mg (0.319 mmol) Produkt als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 65%. **Schmp.:** 195°C. **R_f:** 0.86 (EA/CH = 3:1). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 0.96 (dt, 12 H, H-29, $^3J = 6.7$ Hz), 1.33 (m, 4 H, H-28), 1.36 (s, 9 H, H-33), 1.44 (s, 18 H, H-33), 1.49 (m, 4 H, H-28), 1.84 (m, 8 H, H-27), 2.47 (bs, 4 H, H-17, H-18), 3.00 (dd, 4 H, H-25, $^2J = 16.0$ Hz), 3.69 (dt, 4 H, H-26, $^3J = 6.8$ Hz), 3.73 (t, 4 H, H-26, $^3J = 7.0$ Hz), 3.81 (s, 3 H, H-7), 3.83 (s, 3 H, H-14), 3.86 (t, 4 H, H-26, $^3J = 7.9$ Hz), 4.29 (dd, 4 H, H-25, $^2J = 13.4$ Hz), 6.48 (s, 2 H, H-22), 6.61 (s, 2 H, H-22), 6.85 (d, 1 H, H-4, $^4J = 1.7$ Hz), 6.88 (d, 1 H, H-11, $^4J = 1.9$ Hz), 6.97 (m, 4 H, H-22), 7.11 (d, 1 H, H-13, $^4J = 1.6$ Hz), 7.45 (d, 1 H, H-6, $^4J = 1.8$ Hz), 8.48 (s, 1 H, H-30), 8.94 (s, 2 H, H-30), 9.30 (s, 1 H, H-20), 9.81 (s, 1 H, H-8), 9.86 (s, 1 H, H-15). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 13.86, 13.93 (C-29), 18.74, 19.00 (C-28), 28.11, 28.17 (C-33), 30.75 (C-17, C-18), 31.10 (C-25), 31.84, 31.86 (C-27), 36.03 (C-7), 36.13 (C-14), 50.92 (C-1), 74.24, 74.54 (C-26), 78.22, 78.39 (C-32),

103.90 (C-11), 108.33 (C-4), 118.07 (C-13), 118.47 (C_q), 118.66, 119.27, 119.54 C-22), 120.72 (C-6), 122.15, 122.42, 122.88, 125.51, 126.19, 132.76, 133.32, 134.87, 135.73, 151.07, 151.42, 151.63, 152.81, 152.94, 158.36, 160.77, 168.63, 169.45 (C_q). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₇₆H₁₀₂N₈NaO₁₅]⁺: *m/z* 1389.7357, gef.: *m/z* 1389.7365.

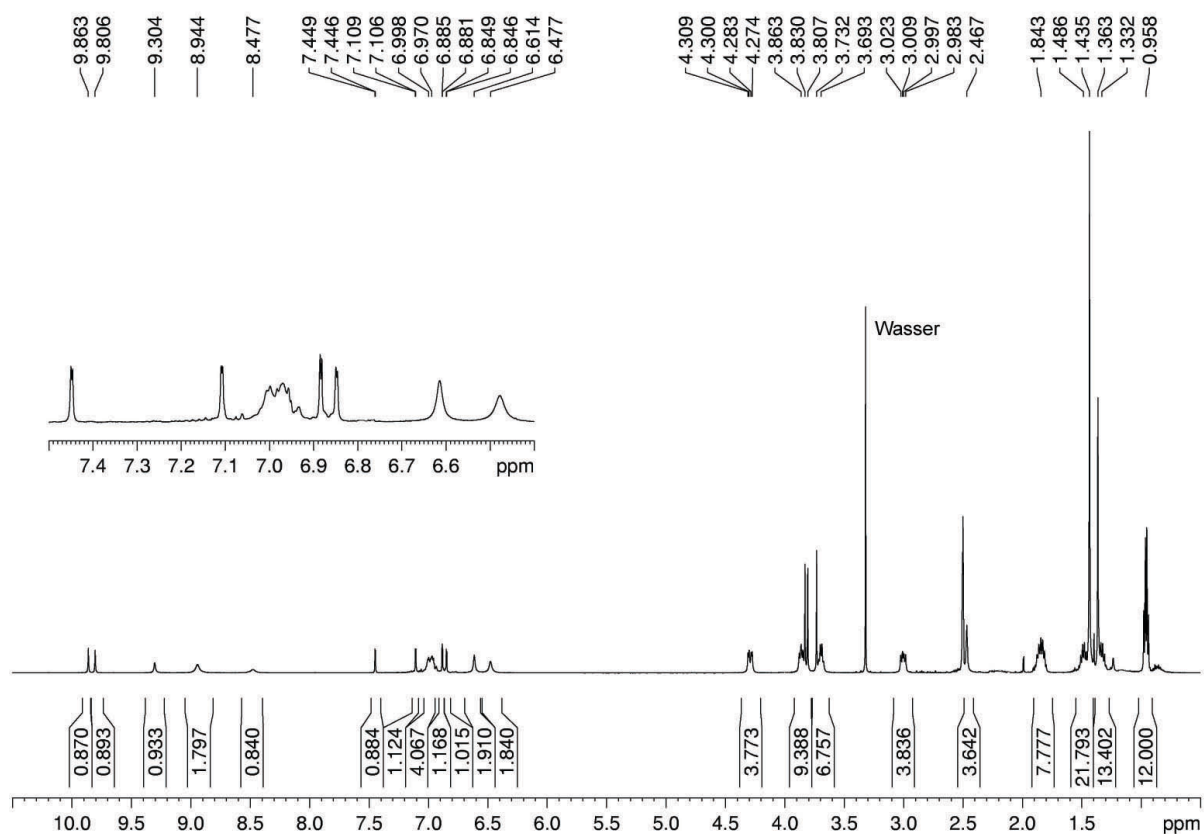
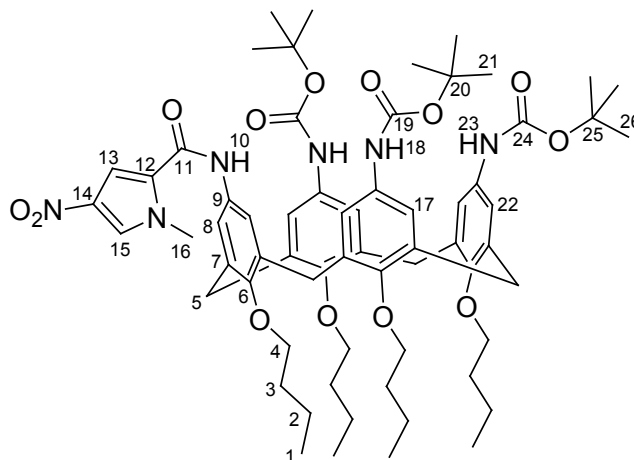


Abbildung 143: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆) von **68**.

Darstellung von 1-Methyl-4-nitro-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-[5,11,17-tris-[(*tert*-butoxy-carbonyl)-amino]-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid] 62



Durchführung:

200 mg Calixaren **13** (0.198 mmol, 1.0 eq.) werden in 40 mL abs. DCM/abs. DMF (1:1) gelöst, mit 76 mg EDCI (0.396 mmol, 2.0 eq.), 61 mg DMAP (0.495 mmol, 2.5 eq.) und 34 mg Nitropyrrolsäure **64** (0.198 mmol, 1.0 eq.) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit 40 mL DCM versetzt und mit Wasser (3x 30 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, CH/EA = 3:1) gereinigt und im HV getrocknet. Es werden 174 mg (0.150 mmol) Produkt als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 76%. **Schmp.:** 173-174°C. **R_f:** 0.42 (CH/EA = 3:1). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 0.98 (t, 12 H, H-1, ³*J* = 7.4 Hz); 1.33 (s, 9 H, H-26), 1.42 (s, 18 H, H-21), 1.42 (m, 8 H, H-2), 1.88 (m, 8 H, H-3), 3.02 (d, 2 H, H-5, ²*J* = 13.1 Hz), 3.07 (d, 2 H, H-5, ²*J* = 13.1 Hz), 3.74 (dt, 4 H, H-4, ³*J* = 6.9 Hz), 3.85 (t, 4 H, H-4, ³*J* = 7.5 Hz), 3.90 (s, 3 H, H-16), 4.32 (m, 4 H, H-5), 6.67 (s, 2 H, H-8, H-22); 6.92 (s, 4 H, H-17); 6.95 (s, 2 H, H-8, H-22); 7.58 (d, 1 H, H-13, ⁴*J* = 1.9 Hz); 8.15 (d, 1 H, H-15, ⁴*J* = 1.7 Hz); 8.61 (bs, 1 H, H-23), 8.85 (bs, 2 H, H-18), 9.70 (s, 1 H, H-10). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 13.9 (C-1), 18.8, 18.9 (C-2), 28.0 (C-26), 28.2 (C-21), 30.8, 31.6, 31.8 (C-5), 37.5 (C-16), 74.4, 74.6, 74.7 (C-4), 78.3 (C-20, C-25), 108.1 (C-13), 119.0, 120.8 (C-8, C-17, C-22), 126.4 (C_q), 128.2 (C-15), 132.2, 133.1, 133.3, 133.7, 133.8, 134.4, 134.5, 151.1, 151.4, 152.3, 152.9, 158.0, 170.3 (C_q). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₆₅H₈₈N₆NaO₁₃]⁺: *m/z* 1183.6302, gef.: *m/z* 1183.6362.

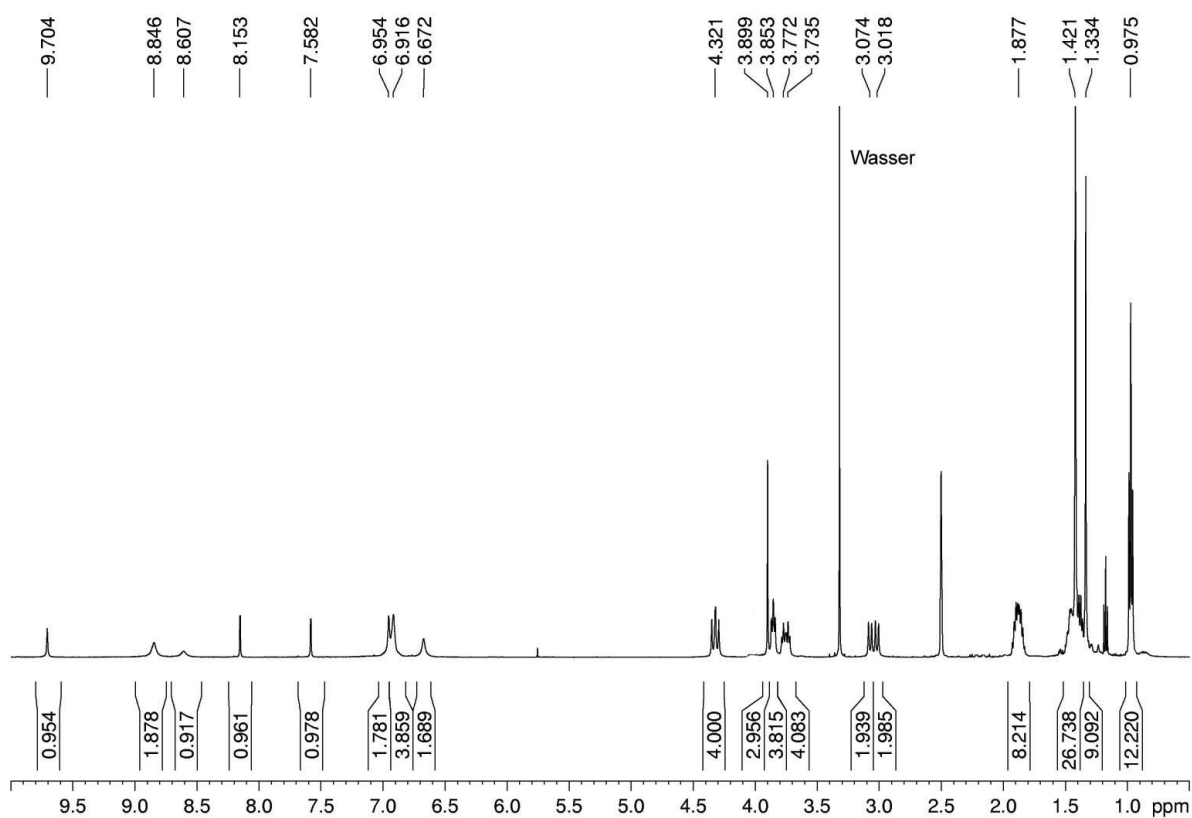
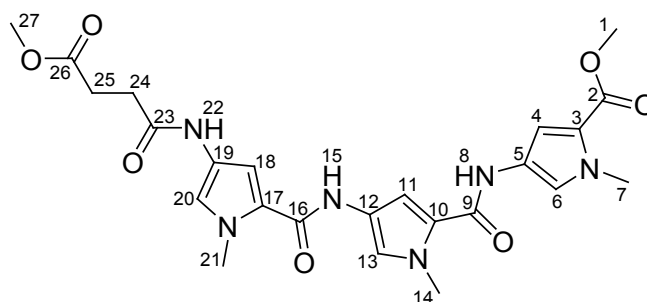


Abbildung 144: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆) von **62**.

5.3.12 Synthese der Tripyrrolkomponenten 70-76 und der Tripyrrolcalix[4]aren-Dimere 78-81

Darstellung von 4-(4-(4-(4-Methoxy-4-oxobutanamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäuremethylester 70



Durchführung:

200 mg Aminopyrrol **51** (0.46 mmol, 1.0 eq.) werden in 30 mL abs. DCM/abs. DMF (2:1) gelöst, mit 56 µL Bernsteinsäuremonomethylesterchlorid **69** (0.46 mmol, 1.0 eq.), 380 µL DIEA (2.30 mmol, 5 eq.) und einer katalytischen Menge DMAP versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit 40 mL DCM versetzt, mit HCl 0.5 M (3x 40 mL) und Wasser (3x 40 mL) gewaschen, getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingengt und im HV getrocknet. Es werden 134 mg (0.26 mmol) Produkt als hellbraunes Öl erhalten.

Ausbeute: 57%. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 2.54, 2.58 (2d, 4 H, H-24, H-25, ³*J* = 7.6 Hz), 3.59 (s, 3 H, H-27), 3.74 (s, 3 H, H-1), 3.83 (s, 3 H, H-7), 3.84 (s, 3 H, H-14, H-21), 6.88 (d, 1 H, H-4, ⁴*J* = 1.9 Hz), 6.91 (d, 1 H, H-18, ⁴*J* = 2.1 Hz), 7.05 (d, 1 H, H-11, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.14 (d, 1 H, H-20, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.23 (d, 1 H, H-13, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.47 (d, 1 H, H-6, ⁴*J* = 1.9 Hz), 9.88 (s, 1 H, H-8), 9.90 (s, 1 H, H-15), 9.92 (s, 1 H, H-22). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 28.74 (C-24), 30.06 (C-25), 36.06 (C-7), 36.10 (C-14), 36.16 (C-21), 50.94 (C-1), 51.32 (C-27), 103.90 (C-18), 104.77 (C-11), 108.36 (C-4), 118.09 (C-20), 118.51 (C-3), 118.59 (C-13), 120.75 (C-6), 121.97 (C-19), 122.21 (C-12), 122.50 (C-10), 122.68 (C-5), 122.98 (C-17), 158.40 (C-16), 158.48 (C-9), 160.81 (C-2), 168.02 (C-23), 172.89 (C-26). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₂₄H₂₈N₆NaO₇]⁺: *m/z* 535.1912, gef.: *m/z* 535.1912.

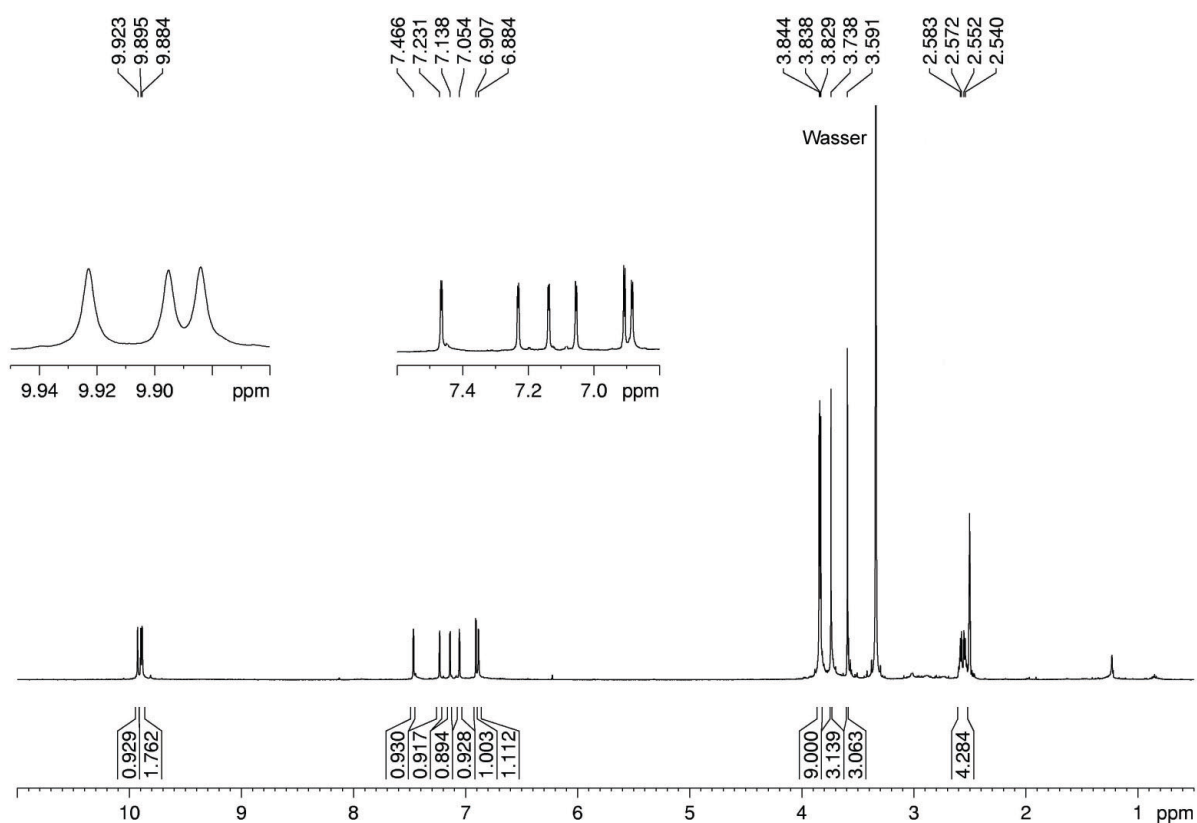
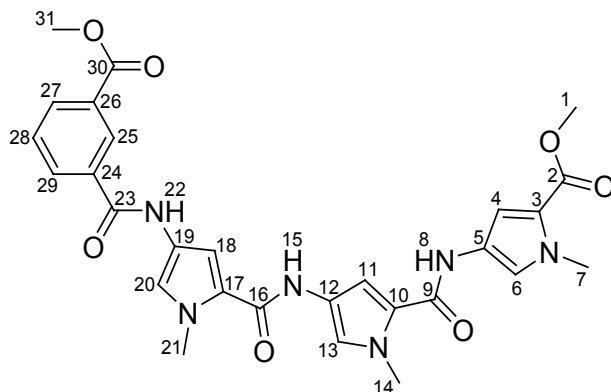


Abbildung 145: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d_6) von **70**.

Darstellung von 4-(4-(4-(3-Methoxycarbonyl)benzamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäuremethylester **76**

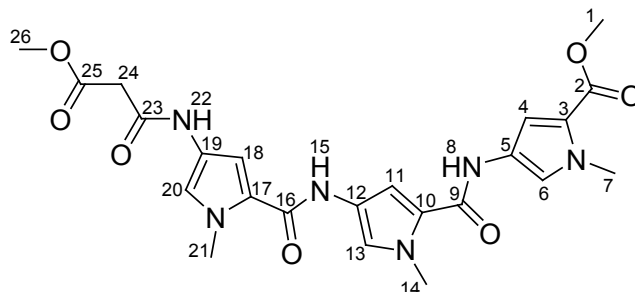


Durchführung:

200 mg Aminopyrrol **51** (0.46 mmol, 1.0 eq.) werden in 30 mL abs. DMF gelöst, mit 83 mg Isophthalsäuremonomethylester **72** (0.46 mmol, 1.0 eq.), 176 mg EDCI (0.92 mmol, 2.0 eq.) und 140 mg DMAP (1.15 mmol, 2.5 eq.) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit 40 mL Ethylacetat versetzt und nacheinander mit 10 %iger HCl (3x 40 mL) und ges. NaHCO₃-Lösung (3x 40 mL) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingeeengt und im HV getrocknet. Es werden 165 mg (0.29 mmol) Produkt als brauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 64%. **Schmp.:** 238°C (Zers.). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.74 (s, 3 H, H-1), 3.84 (s, 3 H, H-7), 3.86 (s, 3 H, H-14), 3.89 (s, 3 H, H-21), 3.91 (s, 3 H, H-31), 6.92 (d, 1 H, H-4, ⁴*J* = 1.7 Hz), 7.08 (d, 1 H, H-11, ⁴*J* = 1.6 Hz), 7.13 (d, 1 H, H-18, ⁴*J* = 1.5 Hz), 7.26 (d, 1 H, H-13, ⁴*J* = 1.5 Hz), 7.36 (d, 1 H, H-20, ⁴*J* = 1.5 Hz), 7.48 (d, 1 H, H-6, ⁴*J* = 1.6 Hz), 7.69 (t, 1 H, H-28, ³*J* = 7.8 Hz), 8.13 (d, 1 H, H-27, ³*J* = 7.7 Hz), 8.22 (d, 1 H, H-29, ³*J* = 7.9 Hz), 8.54 (s, 1 H, H-25), 9.95 (s, 1 H, H-8), 10.01 (s, 1 H, H-15), 10.57 (s, 1 H, H-22). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 36.09 (C-7), 36.17 (C-14), 36.20 (C-21), 50.94 (C-1), 52.40 (C-31), 104.81 (C-11), 104.88 (C-18), 108.39 (C-4), 118.52 (C-3), 118.65 (C-13), 118.97 (C-20), 120.77 (C-6), 121.91 (C-19), 122.24 (C-12), 122.55 (C-10), 122.99 (C-5), 123.05 (C-17), 128.06 (C-25), 129.05 (C-28), 129.87 (C-24), 131.69 (C-27), 132.13 (C-29), 135.15 (C-26), 158.46 (C-16), 158.50 (C-9), 160.82 (C-2), 162.70 (C-23), 165.85 (C-30). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₂₈H₂₈N₆NaO₇]⁺: *m/z* 583.1912, gef.: *m/z* 583.1923.

Darstellung von 4-(4-(4-(3-Methoxy-3-oxopropanamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäuremethylester **77**

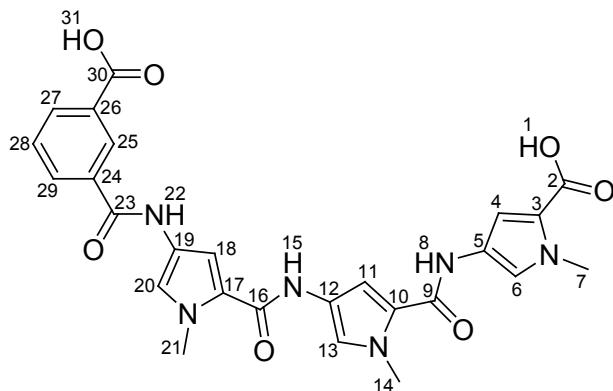


Durchführung:

140 mg Aminopyrrol **51** (0.32 mmol, 1.0 eq.) werden in 30 mL abs. DCM/abs. DMF (2:1) gelöst, mit 35 μ L Malonsäuremethylesterchlorid **73** (0.32 mmol, 1.0 eq.), 266 μ L DIEA (1.61 mmol, 5 eq.), einer katalytischen Menge DMAP versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Lösung wird mit 40 mL DCM versetzt, mit 0.5 M HCl (3x 40 mL) und Wasser (3x 40 mL) gewaschen, getrocknet (Na_2SO_4), filtriert, eingengt und im HV getrocknet. Es werden 86 mg (0.17 mmol) Produkt als hellbraunes Öl erhalten.

Ausbeute: 54%. **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 3.40 (s, 2 H, H-24), 3.64 (s, 3 H, H-26), 3.74 (s, 3 H, H-1), 3.84 (s, 9 H, H-7, H-14, H-21), 6.90 (d, 1 H, H-18, $^4J = 1.9$ Hz), 6.91 (d, 1 H, H-4, $^4J = 1.9$ Hz), 7.05 (d, 1 H, H-11, $^4J = 1.9$ Hz), 7.17 (d, 1 H, H-20, $^4J = 1.7$ Hz), 7.24 (d, 1 H, H-13, $^4J = 1.9$ Hz), 7.47 (d, 1 H, H-6, $^4J = 1.9$ Hz), 9.92 (s, 1 H, H-8), 9.93 (s, 1 H, H-15), 10.10 (s, 1 H, H-22). **$^{13}\text{C-NMR}$** (125.76 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 36.16 (C-7, C-14), 36.19 (C-21), 42.71 (C-24), 50.96 (C-1), 51.92 (C-26), 103.98 (C-18), 104.78 (C-11), 108.38 (C-4), 118.28 (C-20), 118.53 (C-3), 118.64 (C-13), 120.77 (C-6), 121.54 (C-19), 122.17 (C-12), 122.53 (C-10), 122.90 (C-5), 122.99 (C-17), 158.35 (C-16), 158.49 (C-9), 160.83 (C-23), 162.24 (C-2), 168.36 (C-25). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für $[\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_7]^+$: m/z 499.1936, gef.: m/z 499.1951; ber. für $[\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{NaO}_7]^+$: m/z 521.1755, gef.: m/z 521.1763.

Darstellung von 4-(4-(4-(3-Carboxbenzamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure **74**



Durchführung:

164 mg Diester **76** (0.29 mmol, 1.0 eq.) werden in 45 mL MeOH suspendiert, mit 2.5 mL 2 M NaOH versetzt und 48 h bei 60°C gerührt. Die abgekühlte Lösung wird mit 30 mL Wasser versetzt und mit Diethylether (3x 30 mL) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird mit 10%iger H₂SO₄ auf pH = 3 eingestellt und mit Ethylacetat (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingeeengt und im HV getrocknet. Es werden 146 mg (0.27 mmol) des Produkts **74** in Form eines braunen viskosen Öls erhalten.

Ausbeute: 95%. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.83 (s, 3 H, H-7), 3.86 (s, 3 H, H-14), 3.89 (s, 3 H, H-21), 6.86 (d, 1 H, H-4, ⁴*J* = 2.0 Hz), 7.08 (d, 1 H, H-11, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.13 (d, 1 H, H-18, ⁴*J* = 1.9 Hz), 7.26 (d, 1 H, H-13, ⁴*J* = 1.7 Hz), 7.36 (d, 1 H, H-20, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.43 (d, 1 H, H-6, ⁴*J* = 1.9 Hz), 7.66 (t, 1 H, H-28, ³*J* = 7.8 Hz), 8.11 (dt, 1 H, H-29, ³*J* = 7.8 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz), 8.19 (dt, 1 H, H-27, ³*J* = 8.0 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz), 8.54 (t, 1 H, H-25, ⁴*J* = 1.6 Hz), 9.91 (s, 1 H, H-8), 10.00 (s, 1 H, H-15), 10.55 (s, 1 H, H-22), 12.72 (bs, 2 H, H-1, H-31). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 36.08 (C-7, C-14), 36.16 (C-21), 104.76 (C-11), 104.87 (C-18), 108.41 (C-4), 118.57 (C-13), 118.93 (C-20), 119.50 (C-3), 120.29 (C-4), 121.96 (C-19), 122.23 (C-12), 122.61 (C-10), 122.70 (C-5), 123.04 (C-17), 128.20 (C-25), 128.83 (C-28), 131.03 (C-24), 131.75 (C-27), 131.85 (C-29), 135.01 (C-26), 158.46 (C-9, C-16), 161.97 (C-2), 162.86 (C-23), 166.91 (C-30). **HRMS** (ESI-neg., MeOH): ber. für [C₂₆H₂₃N₆O₇]⁻: *m/z* 531.1634, gef.: *m/z* 531.1639.

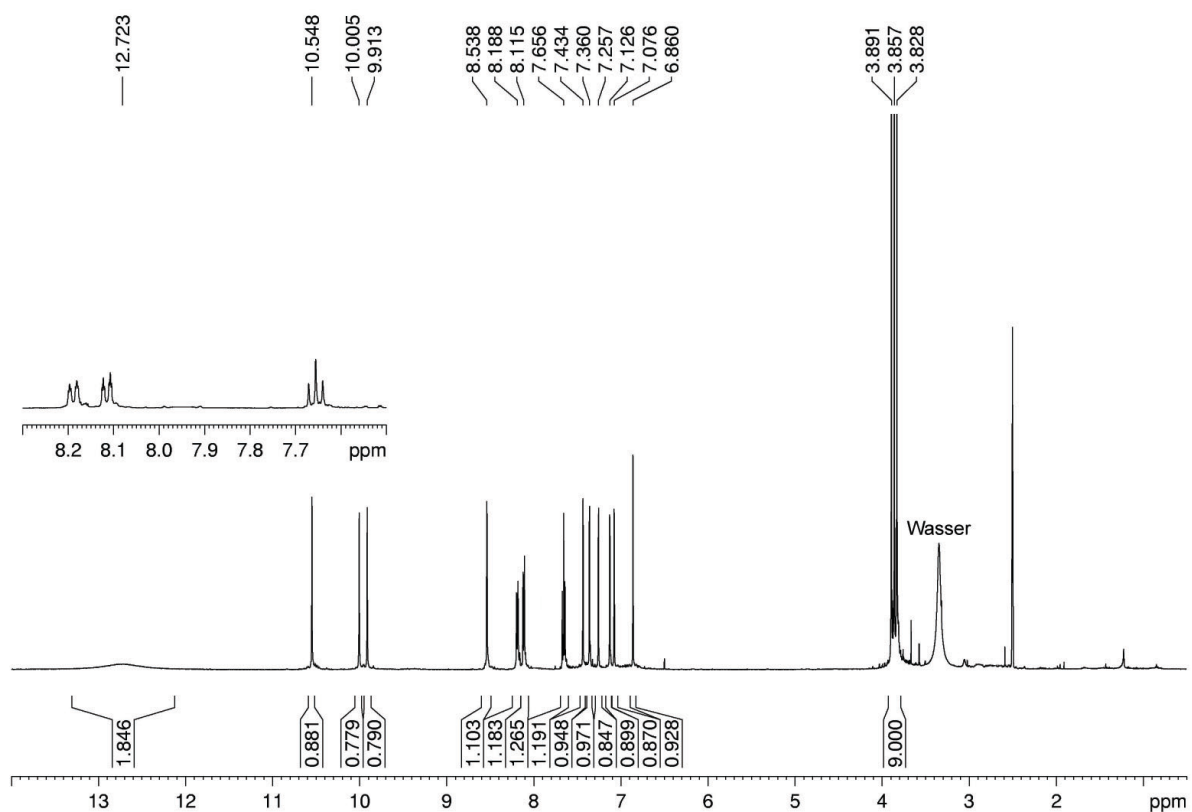
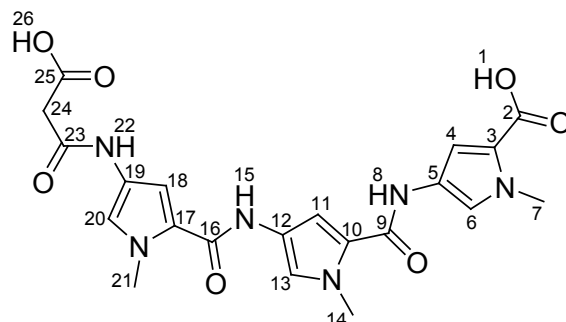


Abbildung 146: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d₆) von 74.

Darstellung von 4-(4-(4-(2-Carboxyacetamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure **75**



Durchführung:

140 mg Diester **77** (0.281 mmol, 1.0 eq.) werden in 40 mL MeOH gelöst, mit 4 mL 2 M NaOH versetzt und 48 h bei 60°C gerührt. Die abgekühlte Lösung wird mit 50 mL Wasser versetzt und mit Diethylether (3x 30 mL) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird mit 10%iger H₂SO₄ auf pH = 3 eingestellt und mit Ethylacetat (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingeeengt und im HV getrocknet. Es werden 87 mg (0.185 mmol) des Produkts **75** als brauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 66%. **Schmp.:** 178°C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.28 (s, 2 H, H-24), 3.82 (s, 3 H, H-7), 3.83 (s, 3 H, H-14), 3.84 (s, 3 H, H-21), 6.85 (d, 1 H, H-4, ⁴*J* = 2.0 Hz), 6.89 (d, 1 H, H-18, ⁴*J* = 1.9 Hz), 7.05 (d, 1 H, H-11, ⁴*J* = 1.9 Hz), 7.17 (d, 1 H, H-20, ⁴*J* = 2.0 Hz), 7.24 (d, 1 H, H-13, ⁴*J* = 2.0 Hz), 7.42 (d, 1 H, H-6, ⁴*J* = 2.0 Hz), 9.90 (s, 1 H, H-8), 9.91 (s, 1 H, H-15), 10.04 (s, 1 H, H-22), 12.39 (bs, 2 H, H-1, H-26). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 36.08 (C-7, C-14), 36.14 (C-21), 43.12 (C-24), 103.94 (C-18), 104.73 (C-11), 108.39 (C-4), 118.25 (C-20), 118.56 (C-13), 119.50 (C-3), 120.28 (C-6), 121.66 (C-19), 122.15 (C-12), 122.59 (C-5), 122.69 (C-10), 122.84 (C-17), 158.35 (C-16), 158.44 (C-9), 161.96 (C-2), 162.84 (C-23), 169.46 (C-25). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₂₁H₂₂N₆NaO₇]⁺: *m/z* 493.1442, gef.: *m/z* 493.1404.

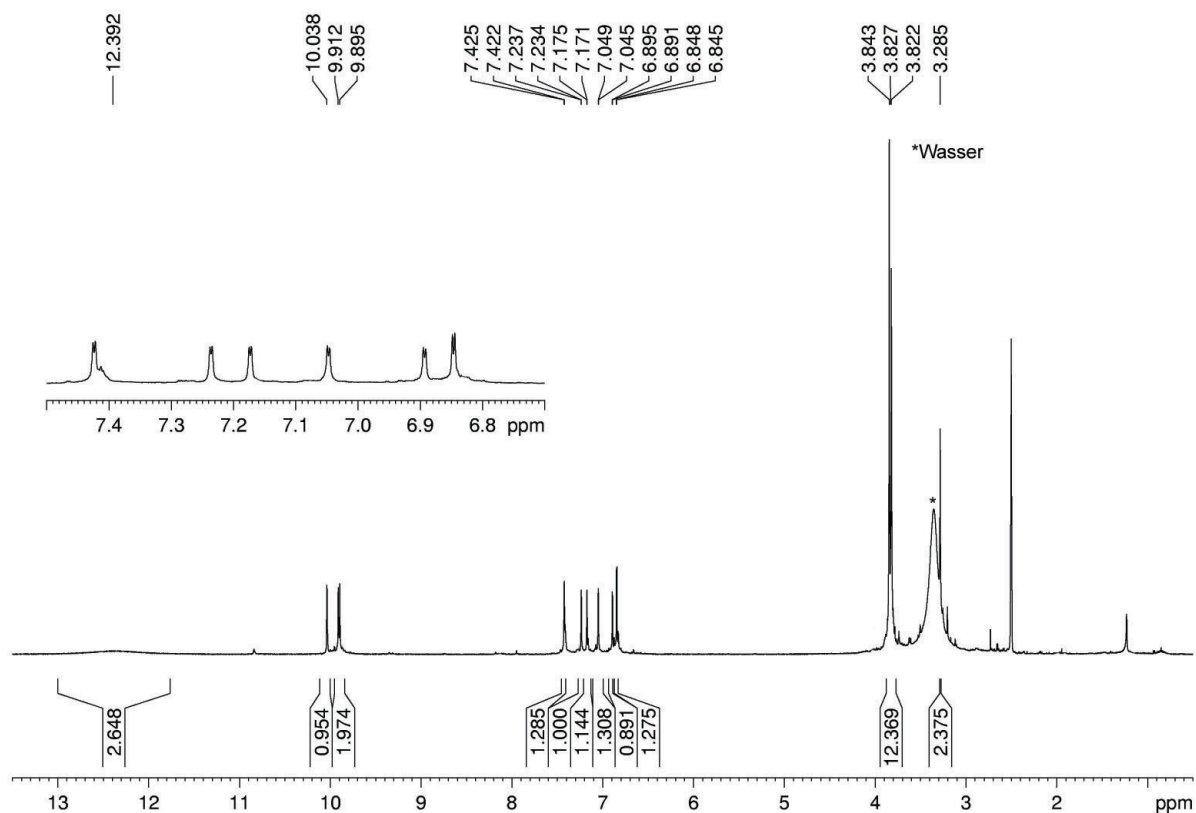
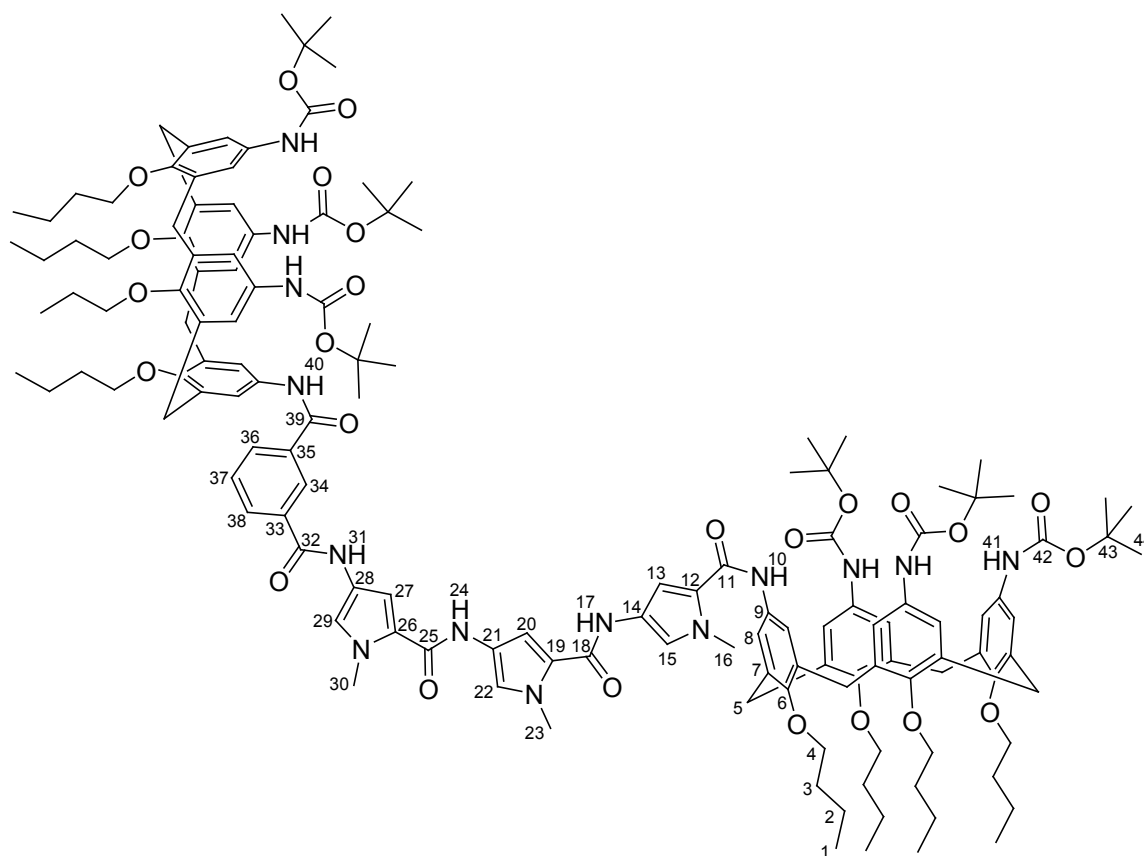


Abbildung 147: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d_6) von 75.

Darstellung von 4-(4-(4-(3-Carboxbenzamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-bis-[5,11,17-tris-[(*tert*.-butoxycarbonyl)-amino]-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid] **78**



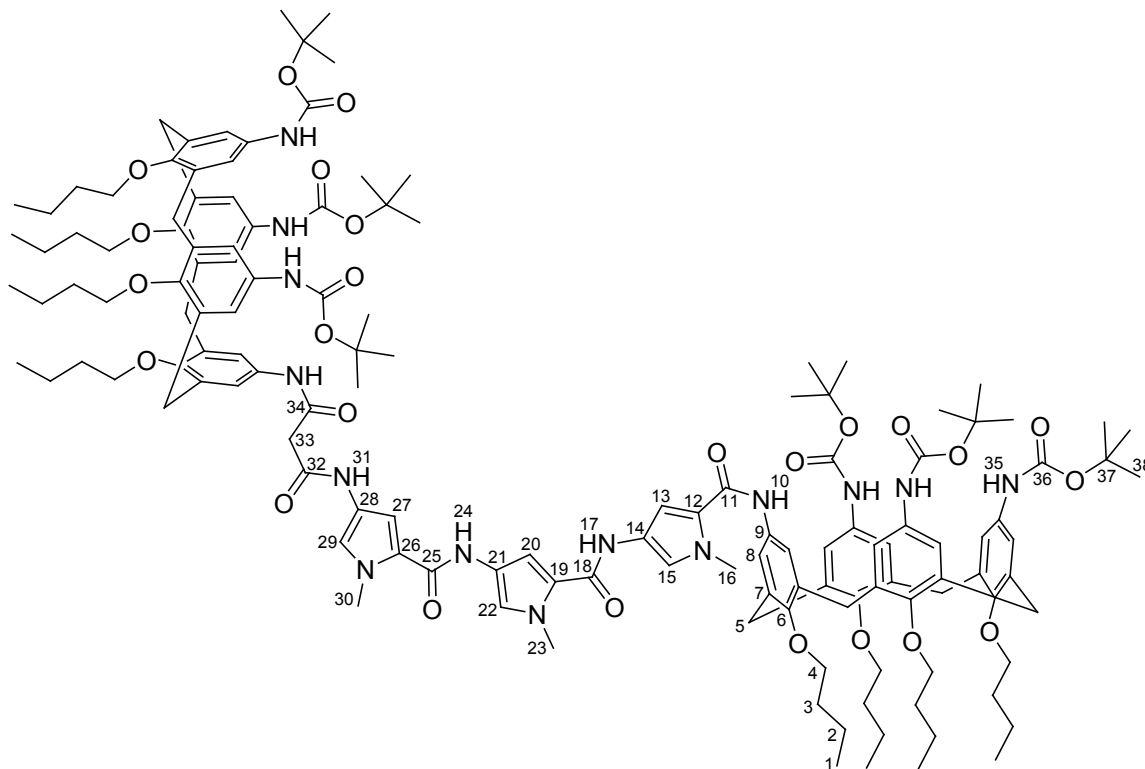
Durchführung:

0.155 g Calixaren **13** (0.154 mmol, 2.0 eq.) werden in 30 mL abs. DCM/abs. DMF (1:1) gelöst. Nacheinander werden 0.059 g EDCI (0.308 mmol, 4.0 eq.), 0.047 g DMAP (0.385 mmol, 5.0 eq.) und 0.041 g Disäure **74** (0.077 mmol, 1.0 eq.) hinzugegeben und die Lösung 48 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 20 mL DCM versetzt und mit Wasser (3x 20 mL) extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet (Na₂SO₄), filtriert, eingengt und im HV (Wasserbad 40°C) getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel (KG 60, erst CH/EA = 3:1, dann EA/DCM = 1:1) konnten 0.039 g (0.016 mmol) **78** als hellbrauner Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 20%. **Schmp.:** 248°C (Zers.). **R_f:** 0.0 (CH/EA = 3:1), 0.9 (EA/DCM = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 0.98 (m, 24 H, H-1), 1.37 (s, 9 H, H-44), 1.39 (m, 16 H, H-2), 1.41 (s, 45 H, H-4), 1.89 (m, 16 H, H-3), 3.05 (m, 8 H, H-5), 3.74 (m, 4 H, H-4), 3.80 (m, 4 H, H-4), 3.82 (s, 3 H, H-16), 3.85 (m, 8 H, H-4), 3.86 (s, 3 H, H-23), 3.89 (s, 3 H,

H-30), 4.35 (m, 8 H, H-5), 6.66 (s, 2 H, H_{Ar}), 6.80 (s, 4 H, H_{Ar}), 6.84 (s, 2 H, H_{Ar}), 6.93 (s, 4 H, H_{Ar}), 7.05 (s, 2 H, H_{Ar}), 7.08 (s, 2 H, H_{Ar}), 7.12 (s, 1 H, H_{Ar}), 7.15 (s, 2 H, H_{Ar}), 7.23 (s, 1 H, H_{Ar}), 7.24 (s, 1 H, H_{Ar}), 7.34 (s, 1 H, H_{Ar}), 7.60 (t, 1 H, H-37, $^3J = 7.6$ Hz), 8.03 (d, 1 H, H-36, $^3J = 7.5$ Hz), 8.07 (d, 1 H, H-38, $^3J = 7.6$ Hz), 8.44 (s, 1 H, H-34), 8.58 (bs, 1 H, N-H), 8.74 (bs, 4 H, N-H), 8.84 (bs, 1 H, N-H), 9.53 (s, 1 H, N-H), 9.90 (s, 1 H, N-H), 9.98 (s, 1 H, N-H), 10.00 (s, 1 H, N-H), 10.44 (s, 1 H, N-H). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 13.89, 13.93 (C-1), 18.87, 18.91, 18.95 (C-2), 28.04, 28.09, 28.15 (C-44), 30.76 (C-5), 31.59, 31.68, 31.71, 31.80 (C-3), 36.05 (C-16), 36.14 (C-23, C-30), 74.38, 74.51 (C-4), 78.21, 78.34 (C-43), 104.74, 104.93, 105.41, 118.38, 118.68, 118.79, 118.96, 119.17, 120.79, 120.92 (C_{Ar}), 121.98, 122.12, 122.18, 122.80, 122.91, 123.09 (C_q), 126.78 (C-34), 128.27 (C-37), 130.04 (C-36, C-38), 132.71, 133.05, 133.21, 133.32, 133.67, 133.97, 134.15, 134.39, 134.54, 134.71, 135.34, 151.17, 151.48, 151.98, 152.32, 152.81, 152.86, 152.88, 158.44, 158.47, 159.50, 163.21, 164.53 (C_q). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₄₄H₁₈₈N₁₄Na₂O₂₅]²⁺: m/z 1280.1843, gef.: m/z 1280.1878.

Darstellung von 4-(4-(4-(2-Carboxyacetamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-bis-[5,11,17-tris-[(*tert*.-butoxycarbonyl)-amino]-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid] **81**



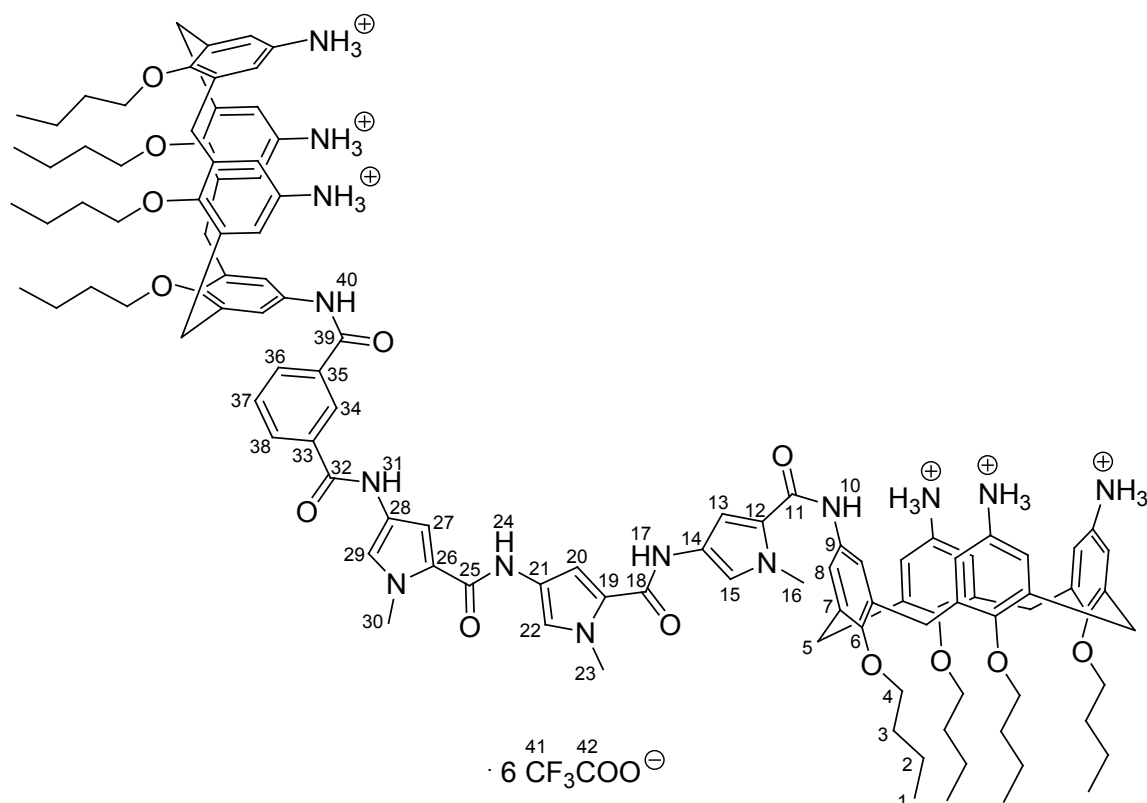
Durchführung:

335 mg Triboc-Calixaren **13** (0.332 mmol, 2.0 eq.) werden in 30 mL abs. DCM/abs. DMF (1:1) gelöst und nacheinander mit 127 mg EDCI (0.663 mmol, 4.0 eq.), 101 mg DMAP (0.829 mmol, 5.0 eq.) und 78 mg Tripyrrol-Disäure **75** (0.166 mmol, 1.0 eq.) versetzt. Die Reaktionslösung wird 48 h bei RT gerührt, mit 20 mL DCM versetzt und mit Wasser (2x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet (Na₂SO₄), filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (KG 60, erst CH/EA = 3:1 um Edukt zu eluieren, dann EA/DCM = 1:1 um das Produkt zu isolieren) gereinigt und im HV getrocknet. Es werden 138 mg (0.056 mmol) des Produkts **81** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 34%. **Schmp.:** 94-98°C. **R_f:** 0.0 (CH/EA = 3:1), 0.8 (EA/DCM = 1:1). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 0.98 (m, 24 H, H-1), 1.34 (m, 8 H, H-2), 1.36 (s, 9 H, H-38), 1.37 (s, 9 H, H-38), 1.39 (s, 18 H, H-38), 1.44 (s, 18 H, H-38), 1.49 (m, 8 H, H-2), 1.88 (m, 16 H, H-3), 3.03 (m, 8 H, H-5), 3.24 (bs, 2 H, H-33), 3.69 (m, 4 H, H-4), 3.80 (m,

8 H, H-4), 3.82, 3.83, 3.85 (3 s, je 3 H, H-16, H-23, H-30), 3.88 (m, 4 H, H-4), 4.31 (m, 8 H, H-5), 6.45 (bs, 2 H, H_{Ar}), 6.58 (bs, 2 H, H_{Ar}), 6.79-6.84 (bs, 6 H, H_{Ar}), 6.89 (s, 1 H, H_{Ar}), 7.01-7.07 (bs, 6 H, H_{Ar}), 7.15 (bs, 3 H, H_{Ar}), 7.22 (bs, 2 H, H_{Ar}), 8.53 (bs, 1 H, N-H), 8.73 (bs, 3 H, N-H), 8.99 (bs, 2 H, N-H), 9.46 (s, 1 H, N-H), 9.53 (s, 1 H, N-H), 9.89 (s, 2 H, N-H), 10.01 (s, 1 H, N-H). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 13.94 (C-1), 18.73, 18.88, 18.91, 19.03 (C-2), 28.09, 28.13, 28.15, 28.18 (C-38), 30.76 (C-5), 31.48, 31.69, 31.72, 31.89 (C-3), 36.10, 36.15 (C-16, C-23, C-30), 45.11 (C-33), 74.24, 74.53, 74.59 (C-4), 78.24, 78.44 (C-37), 103.96, 104.74, 105.42 (C-13, C-20, C-27), 118.14, 118.40, 118.60, 118.68, 118.97, 119.20, 119.67, 120.79, (C-8, C-15, C-22, C-29), 121.73, 122.10, 122.79, 122.82, 122.92, 126.21, 127.36, 129.29, 130.13, 132.30, 132.80, 133.20, 133.39, 133.98, 134.17, 135.00, 151.00, 151.26, 151.69, 152.00, 152.83, 152.89, 152.93, 158.36, 158.47, 159.51, 163.78, 164.77, 172.00 (C_q). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₃₉H₁₈₆N₁₄Na₂O₂₅]²⁺: *m/z* 1249.1765, gef.: *m/z* 1249.1818, ber. für [C₁₃₉H₁₈₆N₁₄NaO₂₅]⁺: *m/z* 2475.3638, gef.: *m/z* 2475.3682.

Darstellung von 4-(4-(4-(3-Carboxbenzamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-bis-[5,11,17-tri-amino-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid]-hexa-(trifluoracetat) 79



Durchführung:

32 mg Boc-Dimer **78** (12.7 μmol) werden in 5 mL abs. DCM gelöst, mit 5 mL TFA versetzt und 24 h bei RT gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels und Trocknung im HV werden 33 mg (12.7 μmol) des Produkts als hellbrauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: quant. **Schmp.:** 235°C (Zers.). **¹H-NMR** (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 1.05 (m, 24 H, H-1), 1.46 (m, 8 H, H-2), 1.58 (m, 8 H, H-2), 1.95 (m, 16 H, H-3), 3.30 (m, 8 H, H-5), 3.91 (m, 8 H, H-4), 3.92 (s, 3 H, H-16), 3.93 (s, 3 H, H-23), 3.95 (s, 3 H, H-30), 4.02 (m, 4 H, H-4), 4.09 (m, 4 H, H-4), 4.54 (m, 8 H, H-5), 6.56 (d, 2 H, H-8, ⁴*J* = 2.1 Hz), 6.59 (d, 2 H, H-8, ⁴*J* = 2.1 Hz), 6.67 (d, 2 H, H-8, ⁴*J* = 2.0 Hz), 6.69 (d, 2 H, H-8, ⁴*J* = 2.0 Hz), 6.76 (s, 1 H, H_{Py}), 6.94 (d, 4 H, H-8, ⁴*J* = 2.2 Hz), 7.00 (d, 1 H, H_{Py}, ⁴*J* = 1.6 Hz), 7.04 (d, 1 H, H_{Py}, ⁴*J* = 1.6 Hz), 7.06 (d, 1 H, H_{Py}, ⁴*J* = 1.7 Hz), 7.17 (s, 2 H, H-8), 7.20 (d, 1 H, H_{Py}, ⁴*J* = 1.6 Hz), 7.24 (s, 2 H, H-8), 7.34 (d, 1 H, H_{Py}, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.66 (t, 1 H, H-37,

$^3J = 7.6$ Hz), 8.11 (m, 2 H, H-36, H-38), 8.48 (bs, 1 H, H-34). **^{13}C -NMR** (125.6 MHz, MeOH- d_4): δ [ppm] = 14.55, 14.63, 14.69 (C-1), 20.47, 20.49, 20.54, 20.55, 20.76, 20.78 (C-2), 31.92, 32.07 (C-5), 33.42, 33.45, 33.59, 33.61, 33.73, 33.74 (C-3), 36.93 (C-16, C-23, C-30), 76.67, 76.71, 76.89 (C-4), 106.65, 106.84, 107.69 (C_{Ar}), 119.12 (C_{q}), 121.27, 123.27, 123.37 (C_{Ar}), 123.45, 123.53 (C_{q}), 123.72, 123.79, 123.87, 124.02, 124.36 (C_{Ar}), 124.65, 124.78, 125.08, 126.29, 126.34, 126.75 (C_{q}), 128.16 (C-34), 130.16 (C-37), 131.55 (C-36, C-38), 134.12, 134.23, 136.63, 136.77, 137.20, 137.26, 137.96, 138.07, 138.10, 138.63, 138.76, 155.06, 155.42, 157.53, 157.60, 158.50, 158.56, 161.66, 161.76, 162.25, 162.54, 162.80, 166.68, 168.18 (C_{q}). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für $[\text{C}_{114}\text{H}_{142}\text{N}_{14}\text{O}_{13}]^{2+}$: m/z 958.0451, gef.: m/z 958.0519, ber. für $[\text{C}_{114}\text{H}_{141}\text{N}_{14}\text{NaO}_{13}]^{2+}$: m/z 969.0360, gef.: m/z 969.0296.

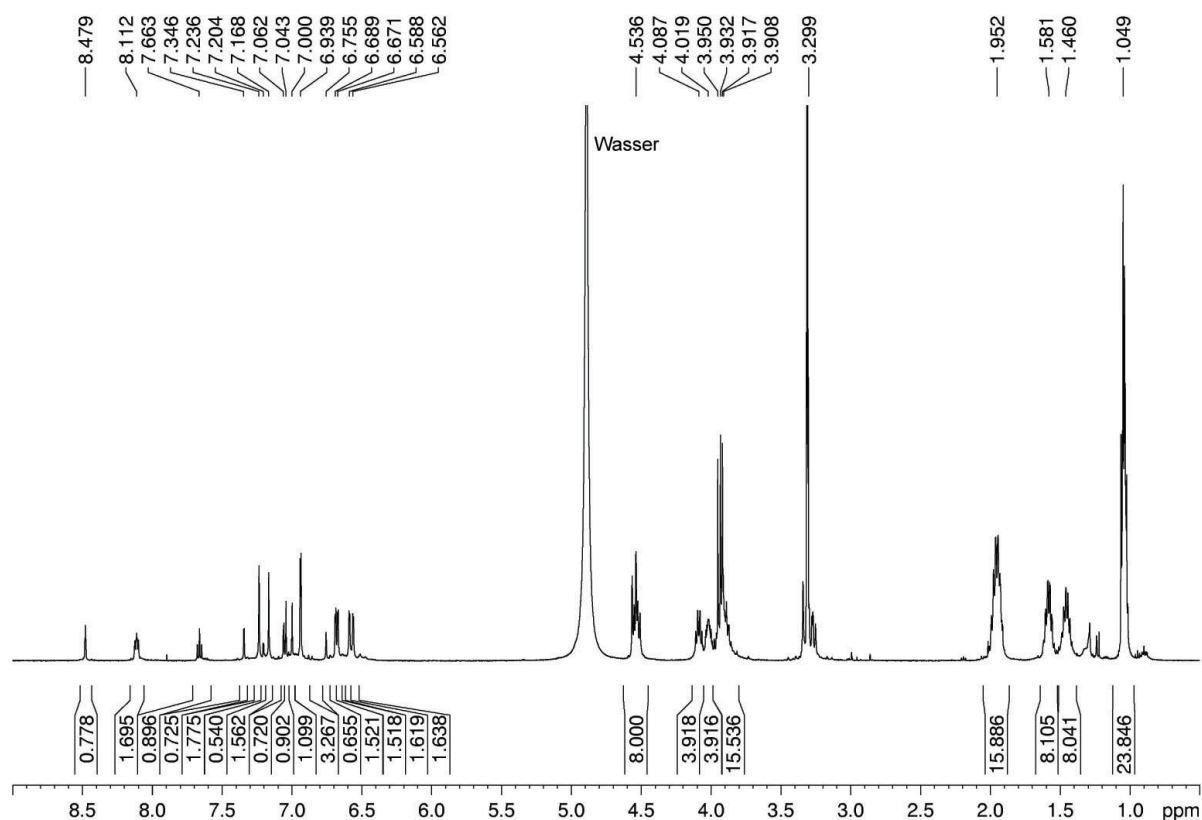
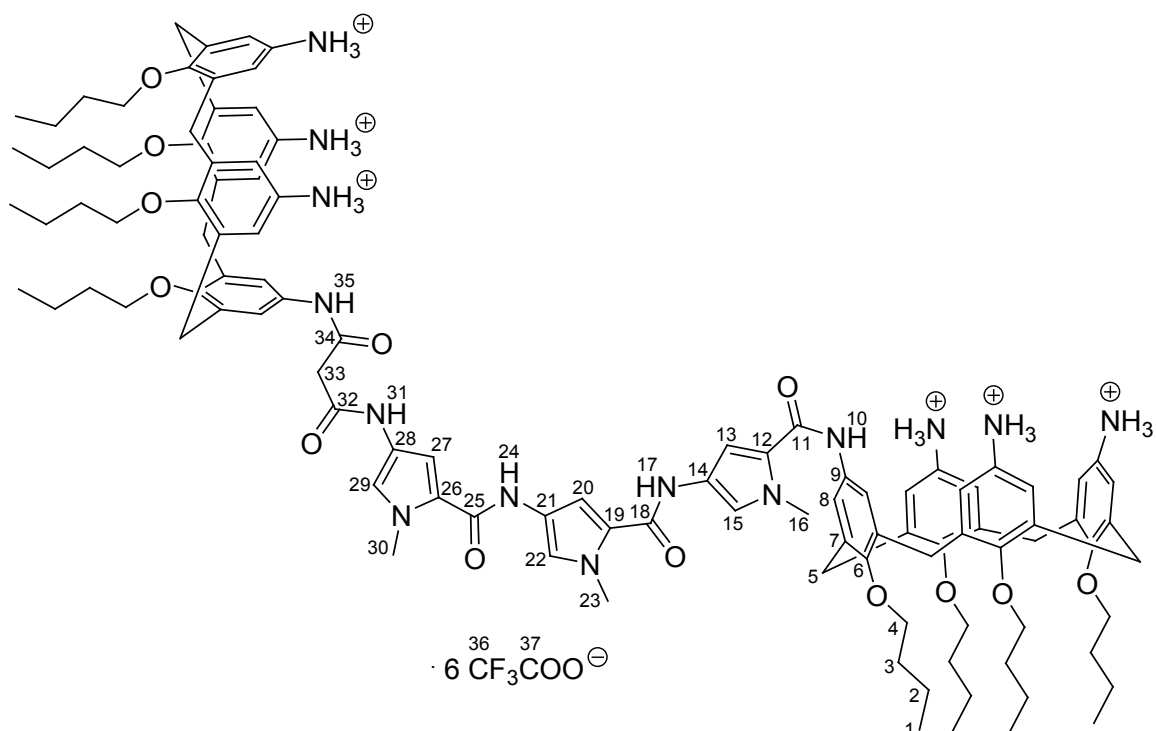


Abbildung 148: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, MeOH- d_4) von **79**.

Darstellung von 4-(4-(4-(2-Carboxyacetamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carboxamido)-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-bis-[5,11,17-tri-amino-25,26,27,28-tetrabutoxycalix[4]aren-23-amid]-hexa-(trifluoracetat) **80**



Durchführung:

78 mg Boc-Dimer **81** (0.032 mmol) werden in 5 mL abs. DCM gelöst, mit 5 mL TFA versetzt und 24 h bei RT gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels und Trocknung im HV werden 82 mg (0.032 mmol) **80** als brauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: quant. **Schmp.:** 180°C (Zers.). **¹H-NMR** (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 1.04 (m, 24 H, H-1), 1.47 (m, 8 H, H-2), 1.57 (m, 8 H, H-2), 1.94 (m, 16 H, H-3), 3.26 (m, 4 H, H-5), 3.30 (m, 6 H, H-5, H-33), 3.90-3.93 (m, 16 H, H-4, H-16, H-23, H-30), 4.01 (m, 6 H, H-4), 4.09 (t, 2 H, H-4, ³*J* = 7.8 Hz), 4.53 (m, 8 H, H-5), 6.60 (d, 2 H, H_{Ar}, ⁴*J* = 2.5 Hz), 6.67 (s, 2 H, H_{Ar}), 6.71 (d, 2 H, H_{Ar}, ⁴*J* = 2.6 Hz), 6.77 (s, 1 H, H_{Ar}), 6.78 (s, 2 H, H_{Ar}), 6.82 (s, 1 H, H_{Ar}), 6.87 (bs, 2 H, H_{Ar}), 6.90 (bs, 2 H, H_{Ar}), 6.93 (s, 2 H, H_{Ar}), 6.98 (s, 1 H, H_{Ar}), 7.04 (s, 1 H, H_{Ar}), 7.15 (s, 2 H, H_{Ar}). **¹³C-NMR** (125.6 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 14.39, 14.45, 14.48, 14.53 (C-1), 20.33, 20.39, 20.53, 20.62 (C-2), 31.65, 31.73, 31.78, 31.87, 31.92 (C-5), 33.27, 33.42, 33.59 (C-3), 36.77, 36.82, 36.95 (C-16, C-23, C-30), 50.01 (C-33), 76.53, 76.67,

76.79 (C-4), 105.56, 106.62, 107.55 (C-13, C-20, C-27), 112.66, 114.92, 116.27, 117.18, 118.61, 119.44 (C_q), 122.39, 123.29, 123.75, 123.80, 123.97, 124.22 (C-8, C-15, C-22, C-29), 126.03, 126.09, 126.17, 126.30, 134.08, 135.53, 136.40, 137.12, 137.60, 137.97, 138.56, 138.88, 154.88, 157.54, 157.87, 158.21, 158.39, 158.45, 158.79, 159.12, 161.46, 161.76, 167.89 (C_q). **HRMS** (ESI-pos., MeOH): ber. für [C₁₀₉H₁₄₄N₁₄O₁₃]⁺: *m/z* 1858.1071, gef.: *m/z* 1858.0999, ber. für [C₁₀₉H₁₄₅N₁₄NaO₁₃]²⁺: *m/z* 929.0536, gef.: *m/z* 929.0529.

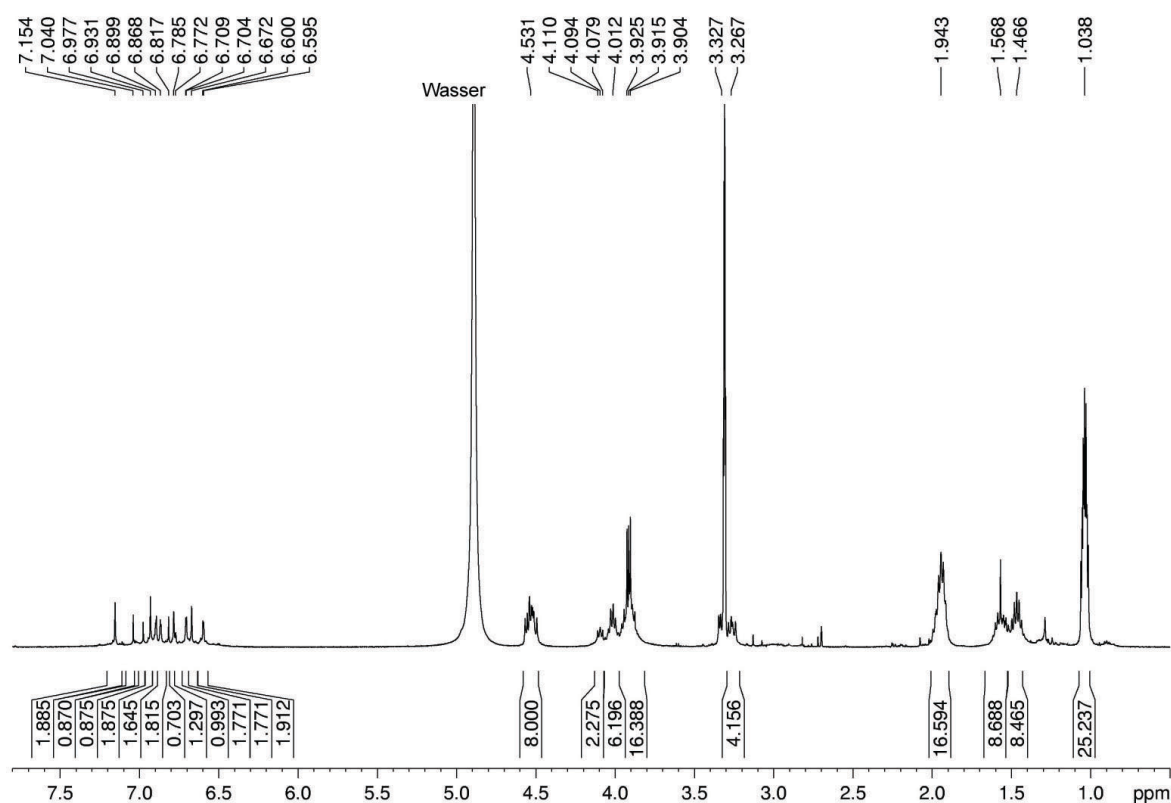


Abbildung 149: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, MeOH-*d*₄) von **80**.

5.4 Bindungsexperimente mit den Calixaren-Dimeren und -Monomeren

5.4.1 Fluoreszenztitrationen

Die DNA-Fluoreszenztitrationen wurden mit Fluorescein markierten DNA-Doppelsträngen durchgeführt. Dazu wurden 2 mL einer DNA-Stammlösung von 2 μ M Konzentration in einer Hepes-gepufferten Methanol/Wasser 1:1-Lösung hergestellt. Der jeweilige verwendete Rezeptor (Calixaren-Dimere und –Monomere) wurde in 1 mL dieser DNA-Lösung so verdünnt, dass die DNA-Konzentration während der gesamten Titration konstant blieb. Zu Beginn der Messung wurde eine 1.5 mL rührbare Quarzküvette mit 700 μ L der 2 μ M DNA-Lösung gefüllt und während der Titration mit bis zu 500 μ L der Rezeptorlösung versetzt. Nach jeder Zugabe wurde die Lösung 3 min gerührt und ein Spektrum bei einer Extinktion von 488 nm im Bereich von 495 nm-600 nm bei einer Temperatur von 25 °C aufgenommen. Die Fluoreszenz-Intensität der jeweiligen Probe wurde bei einer Emission von 522 nm registriert. Vor Bestimmung der Bindungskonstanten wurde die Komplexstöchiometrie über einen Job-Plot bestimmt. Die Bindungskurven wurden durch Simulation eines 1:1-Komplexes mit dem Programm *SigmaPlot 10.0*^[114] über eine nichtlineare Regressionsmethode erhalten.

Folgende Abkürzungen wurden in den Fluoreszenztitrations-Tabellen verwendet:

V_0 = Volumen der zutitrierten Rezeptorlösung

V_{Ges} = Gesamtvolumen der Titrationslösung

$[\text{XX}]_0$ = Gesamtkonzentration der jeweiligen Substanz

$I_{522\text{nm}}$ = Intensität bei 522 nm

ΔI_{obs} = beobachtete Intensitätsänderung

ΔI_{ber} = berechnete Intensitätsänderung

χ = Molenbruch

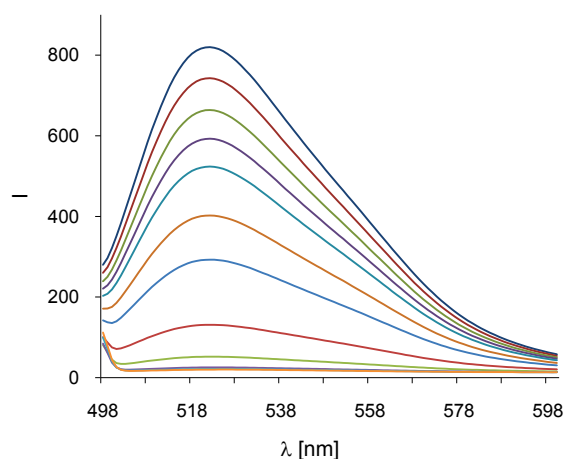
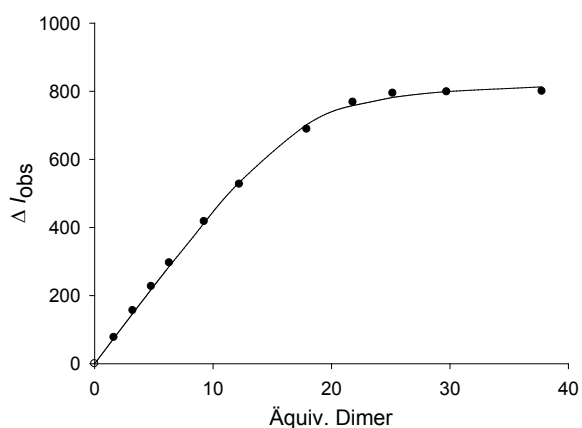
Für die RNA-Fluoreszenztitrationen wurden mit 6-Carboxyfluorescein markierte RNA-Doppelstränge verwendet. Die Messungen wurden wie oben beschrieben durchgeführt, lediglich wurde bei gleicher Anregungswellenlänge die Fluoreszenz-Intensität bei einer Emission von 518 nm bzw. 519 nm registriert.

5.4.1.1 Fluoreszenztitrationen mit 12 BP DNA

Fluoreszenztitration von Dimer 1 mit 12 BP DNA

Rezeptor	Dimer 1	M (1) [g/mol]	2212.22
DNA	12 BP [Fl]-DNA	m (1) [mg]	0.586
T [°C]	25	V (1) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[1] ₀ [mol/L]	$2.65 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[1] [mol/L]	[1] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	819.9	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.28 \cdot 10^{-6}$	1.64	742.9	77.0	75.4	0.379	29.179
10	720	$6.47 \cdot 10^{-6}$	3.24	664.1	155.8	148.4	0.236	36.788
10	730	$9.59 \cdot 10^{-6}$	4.79	593.0	226.9	218.8	0.173	39.160
10	740	$1.26 \cdot 10^{-5}$	6.32	523.7	296.2	286.7	0.137	40.480
20	760	$1.85 \cdot 10^{-5}$	9.25	402.5	417.4	413.7	0.098	40.707
20	780	$2.45 \cdot 10^{-5}$	12.23	292.8	527.0	532.9	0.076	39.839
40	820	$3.58 \cdot 10^{-5}$	17.92	131.2	688.7	702.4	0.053	36.394
30	850	$4.36 \cdot 10^{-5}$	21.81	52.1	767.7	758.2	0.044	33.651
30	880	$5.04 \cdot 10^{-5}$	25.18	25.5	794.3	782.1	0.038	30.341
40	920	$5.95 \cdot 10^{-5}$	29.74	21.6	798.3	799.1	0.033	25.973
80	1000	$7.56 \cdot 10^{-5}$	37.78	20.0	799.8	812.9	0.026	20.625



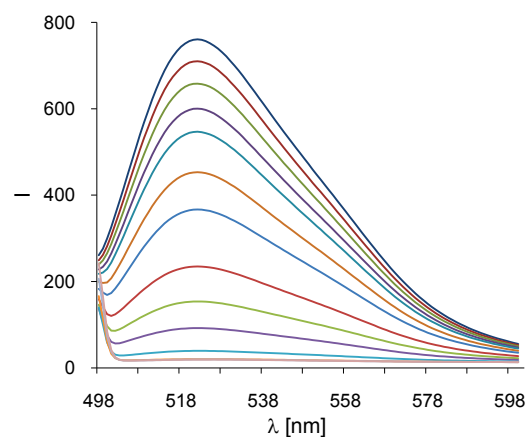
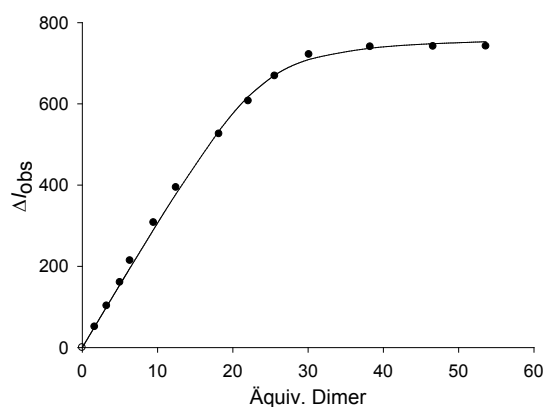
$$K_a = 8.0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (23\%)}$$

Stöchiometrie = 17:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 2 mit 12 BP DNA

Rezeptor	Dimer 2	M (2) [g/mol]	2240.27
DNA	12 BP [Fl]-DNA	m (2) [mg]	0.594
T [°C]	25	V (2) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[2] ₀ [mol/L]	$2.65 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[2] [mol/L]	[2] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	760.8	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.29 \cdot 10^{-6}$	1.65	709.9	51.0	51.3	0.378	19.261
10	720	$6.51 \cdot 10^{-6}$	3.25	658.1	102.7	101.1	0.235	24.145
10	730	$1.00 \cdot 10^{-5}$	5.01	600.4	160.4	155.4	0.166	26.675
10	740	$1.27 \cdot 10^{-5}$	6.35	546.8	214.0	196.3	0.136	29.115
20	760	$1.90 \cdot 10^{-5}$	9.48	453.2	307.7	291.0	0.095	29.348
20	780	$2.49 \cdot 10^{-5}$	12.46	366.7	394.1	378.7	0.074	29.270
40	820	$3.63 \cdot 10^{-5}$	18.17	234.8	526.0	533.3	0.052	27.443
30	850	$4.41 \cdot 10^{-5}$	22.07	153.8	607.1	618.3	0.043	26.317
30	880	$5.11 \cdot 10^{-5}$	25.57	92.1	668.7	671.1	0.038	25.165
40	920	$6.02 \cdot 10^{-5}$	30.12	39.4	721.5	709.4	0.032	23.181
80	1000	$7.65 \cdot 10^{-5}$	38.26	20.3	740.5	737.1	0.025	18.862
100	1100	$9.32 \cdot 10^{-5}$	46.62	19.4	741.4	748.2	0.021	15.568
100	1200	$1.07 \cdot 10^{-4}$	53.65	19.2	741.7	753.2	0.018	13.578



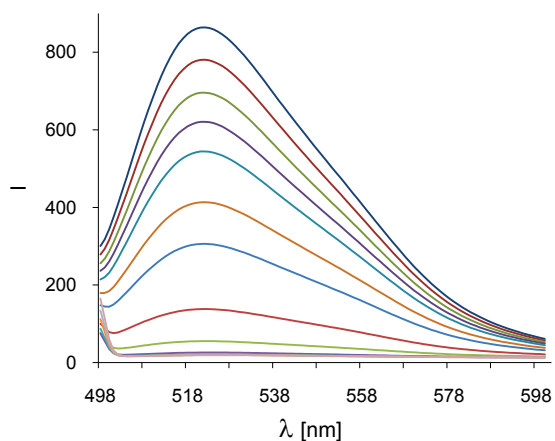
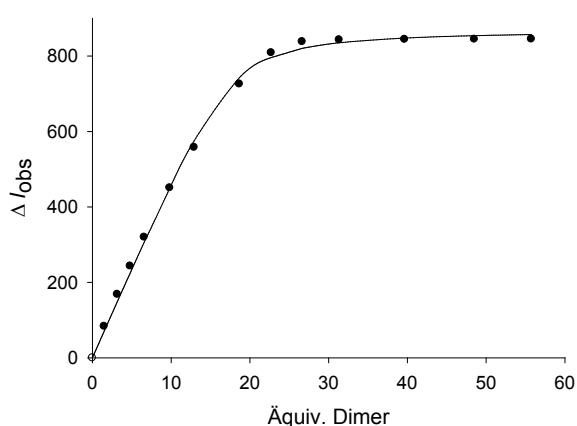
$$K_a = 7.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (25\%)}$$

Stöchiometrie = 24:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 3 mit 12 BP DNA (12 BP)

Rezeptor	Dimer 3	M (3) [g/mol]	2268.32
DNA	12 BP [Fl]-DNA	m (3) [mg]	0.624
T [°C]	25	V (3) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[3] ₀ [mol/L]	2.75·10 ⁻⁴
		[DNA] ₀ [mol/L]	2.00·10 ⁻⁶

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[3] [mol/L]	[3] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	864.1	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	2.99·10 ⁻⁶	1.50	780.5	83.5	70.7	0.401	33.474
10	720	6.33·10 ⁻⁶	3.16	695.8	168.3	149.1	0.240	40.410
10	730	9.59·10 ⁻⁶	4.79	620.7	243.3	224.7	0.173	42.003
10	740	1.32·10 ⁻⁵	6.58	544.3	319.8	306.5	0.132	42.190
20	760	1.97·10 ⁻⁵	9.82	413.5	450.6	450.0	0.092	41.623
20	780	2.58·10 ⁻⁵	12.91	306.0	558.0	575.3	0.072	40.109
40	820	3.73·10 ⁻⁵	18.66	138.1	725.9	742.6	0.051	36.919
30	850	4.54·10 ⁻⁵	22.71	55.4	808.7	796.0	0.042	34.102
30	880	5.33·10 ⁻⁵	26.64	26.0	838.1	820.3	0.036	30.322
40	920	6.27·10 ⁻⁵	31.34	21.0	843.1	835.2	0.031	26.065
80	1000	7.93·10 ⁻⁵	39.65	19.9	844.2	847.6	0.025	20.768
100	1100	9.70·10 ⁻⁵	48.50	19.5	844.6	854.0	0.020	17.060



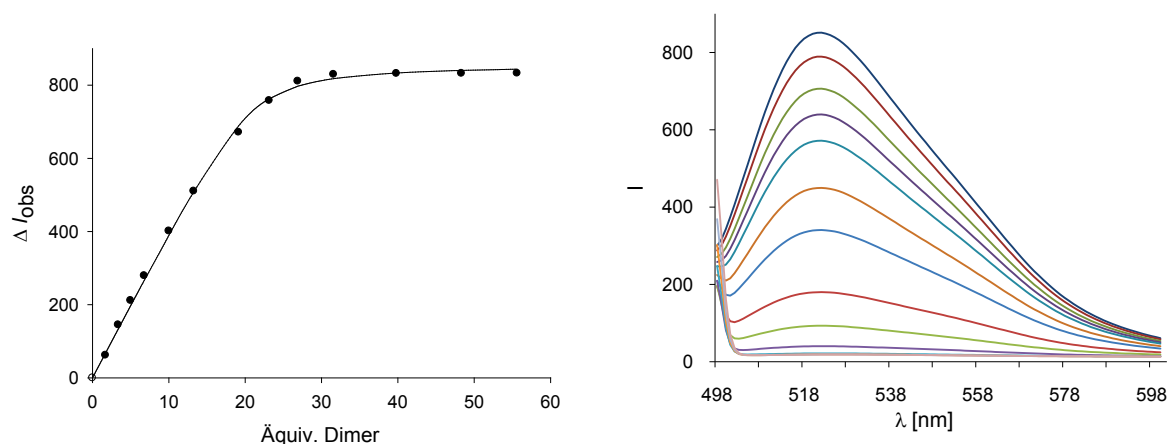
$$K_a = 8.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (24\%)}$$

Stöchiometrie = 18:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 4 mit 12 BP DNA

Rezeptor	Dimer 4	M (4) [g/mol]	2296.38
DNA	12 BP [Fl]-DNA	m (4) [mg]	0.628
T [°C]	25	V (4) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[4] ₀ [mol/L]	$2.73 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[4] [mol/L]	[4] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	851.2	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.41 \cdot 10^{-6}$	1.71	789.4	61.8	67.7	0.369	22.835
10	720	$6.74 \cdot 10^{-6}$	3.37	706.2	145.0	133.4	0.229	33.163
10	730	$9.99 \cdot 10^{-6}$	5.00	639.6	211.6	197.1	0.167	35.290
10	740	$1.36 \cdot 10^{-5}$	6.78	517.8	279.4	266.4	0.129	35.935
20	760	$2.00 \cdot 10^{-5}$	10.01	449.6	401.5	389.8	0.091	36.470
20	780	$2.65 \cdot 10^{-5}$	13.26	340.8	510.4	508.5	0.070	35.781
40	820	$3.83 \cdot 10^{-5}$	19.14	180.0	671.2	688.8	0.050	33.333
30	850	$4.63 \cdot 10^{-5}$	23.15	93.3	757.9	762.7	0.041	31.386
30	880	$5.38 \cdot 10^{-5}$	26.90	40.3	810.9	797.3	0.036	29.068
40	920	$6.31 \cdot 10^{-5}$	31.57	21.7	829.5	817.9	0.031	25.469
80	1000	$7.96 \cdot 10^{-5}$	39.81	19.1	832.1	833.4	0.025	20.388
100	1100	$9.67 \cdot 10^{-5}$	48.33	18.9	832.2	840.4	0.020	16.872
100	1200	$1.11 \cdot 10^{-4}$	55.62	18.7	832.4	843.8	0.018	14.703



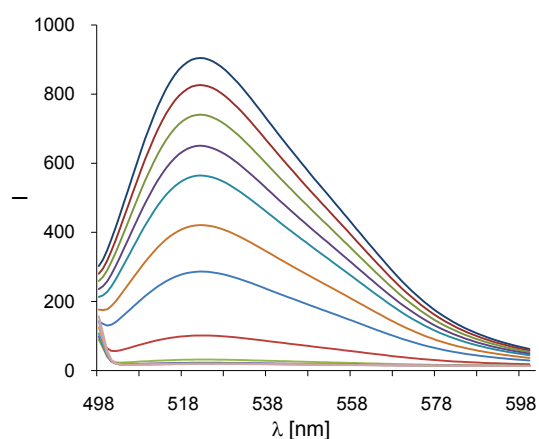
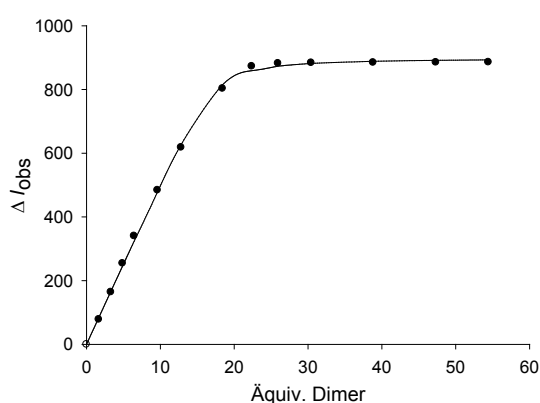
$$K_a = 9.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (20\%)}$$

Stöchiometrie = 21:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 5 mit 12 BP DNA

Rezeptor	Dimer 5	M (5) [g/mol]	2470.30
DNA	12 BP [Fl]-DNA	m (5) [mg]	0.666
T [°C]	25	V (5) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[5] ₀ [mol/L]	$2.70 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[5] [mol/L]	[5] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	904.6	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.34 \cdot 10^{-6}$	1.67	826.2	78.4	84.4	0.375	29.370
10	720	$6.60 \cdot 10^{-6}$	3.30	740.5	164.1	166.4	0.233	38.180
10	730	$9.77 \cdot 10^{-6}$	4.89	650.5	254.1	246.0	0.170	43.162
10	740	$1.29 \cdot 10^{-5}$	6.44	564.5	340.1	323.2	0.134	45.724
20	760	$1.92 \cdot 10^{-5}$	9.61	420.8	483.8	478.6	0.094	45.581
20	780	$2.56 \cdot 10^{-5}$	12.81	286.4	618.2	627.0	0.072	44.764
40	820	$3.68 \cdot 10^{-5}$	18.42	101.5	803.2	814.9	0.051	41.350
30	850	$4.48 \cdot 10^{-5}$	22.38	31.7	872.9	859.1	0.043	37.338
30	880	$5.19 \cdot 10^{-5}$	25.94	22.5	882.2	873.5	0.037	32.750
40	920	$6.09 \cdot 10^{-5}$	30.43	20.8	883.8	881.8	0.032	28.122
80	1000	$7.76 \cdot 10^{-5}$	38.82	19.9	884.8	888.5	0.025	22.222
100	1100	$9.46 \cdot 10^{-5}$	47.31	19.3	885.3	891.5	0.021	18.326
100	1200	$1.09 \cdot 10^{-4}$	54.42	18.9	885.8	893.0	0.018	15.982



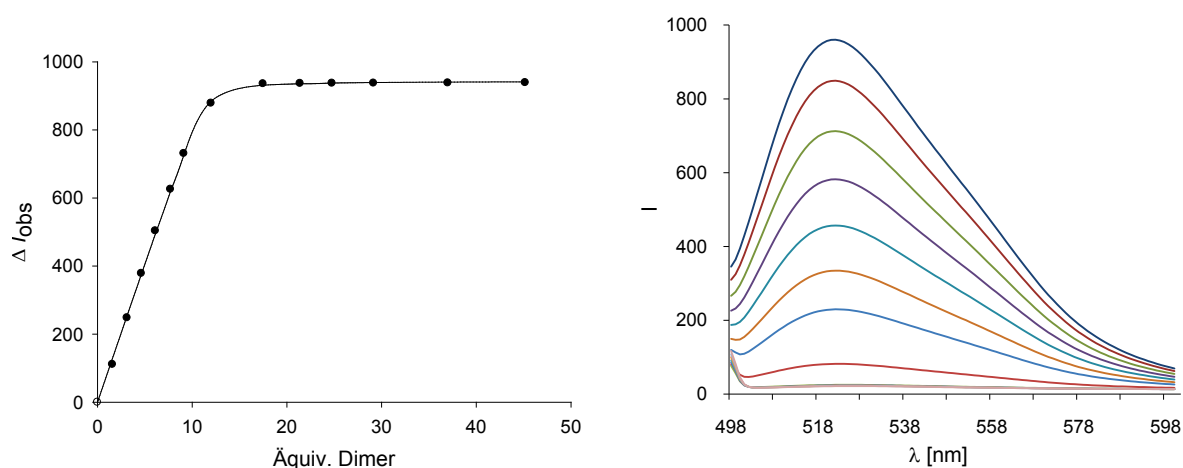
$$K_a = 1.9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (22\%)}$$

Stöchiometrie = 18:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 6 mit 12 BP DNA

Rezeptor	Dimer 6	M (6) [g/mol]	2484.32
DNA	12 BP [Fl]-DNA	m (6) [mg]	0.641
T [°C]	25	V (6) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[6] ₀ [mol/L]	$2.73 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[6] [mol/L]	[6] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	960.3	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.17 \cdot 10^{-6}$	1.58	849.2	111.0	128.8	0.387	42.986
10	720	$6.26 \cdot 10^{-6}$	3.13	712.5	247.8	254.2	0.242	60.040
10	730	$9.27 \cdot 10^{-6}$	4.64	582.0	378.2	375.9	0.177	67.121
10	740	$1.22 \cdot 10^{-5}$	6.11	456.8	503.5	493.8	0.141	70.845
20	760	$1.54 \cdot 10^{-5}$	7.72	334.5	625.7	620.8	0.115	71.745
20	780	$1.82 \cdot 10^{-5}$	9.12	229.6	730.7	726.3	0.099	72.188
40	820	$2.40 \cdot 10^{-5}$	11.99	81.9	878.4	884.6	0.077	67.609
30	850	$3.50 \cdot 10^{-5}$	17.49	24.9	935.4	931.3	0.054	50.589
30	880	$4.28 \cdot 10^{-5}$	21.39	23.6	936.7	936.0	0.045	41.834
40	920	$4.95 \cdot 10^{-5}$	24.77	23.0	937.2	937.9	0.039	36.375
80	1000	$5.83 \cdot 10^{-5}$	29.15	22.7	937.5	939.3	0.033	31.094
100	1100	$7.40 \cdot 10^{-5}$	37.00	22.1	938.1	940.6	0.026	24.686



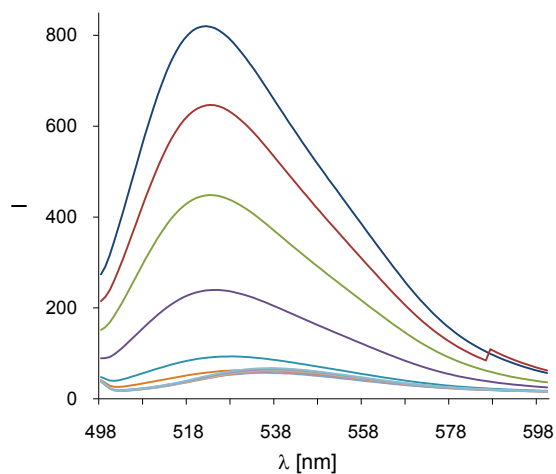
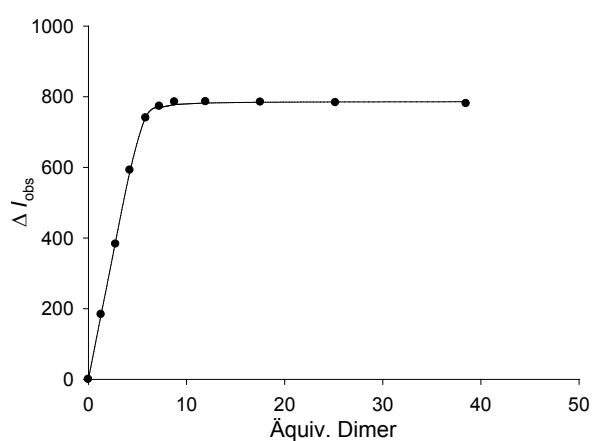
$$K_a = 6.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (22\%)}$$

Stöchiometrie = 12:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 7 mit 12 BP DNA

Rezeptor	Dimer 7	M (7) [g/mol]	1999.09
DNA	12 BP [Fl]-DNA	m (7) [mg]	0.557
T [°C]	25	V (7) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[7] ₀ [mol/L]	$2.79 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[7] [mol/L]	[7] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	830.4	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$2.59 \cdot 10^{-6}$	1.30	646.7	183.7	183.7	0.436	80.011
10	720	$5.56 \cdot 10^{-6}$	2.78	447.7	382.7	392.0	0.265	101.304
10	730	$8.46 \cdot 10^{-6}$	4.23	238.4	592.0	588.7	0.191	113.236
10	740	$1.17 \cdot 10^{-5}$	5.85	90.4	740.0	743.4	0.146	108.057
10	750	$1.45 \cdot 10^{-5}$	7.234	57.6	772.8	770.9	0.121	93.850
10	760	$1.76 \cdot 10^{-5}$	8.78	45.4	785.0	777.9	0.102	80.236
20	780	$2.39 \cdot 10^{-5}$	11.96	44.4	786.0	782.2	0.077	60.656
40	820	$3.51 \cdot 10^{-5}$	17.53	45.9	784.5	784.3	0.054	42.329
60	880	$5.04 \cdot 10^{-5}$	25.18	47.3	783.1	785.3	0.038	29.908
120	1000	$7.70 \cdot 10^{-5}$	38.50	49.8	780.6	785.9	0.025	19.764



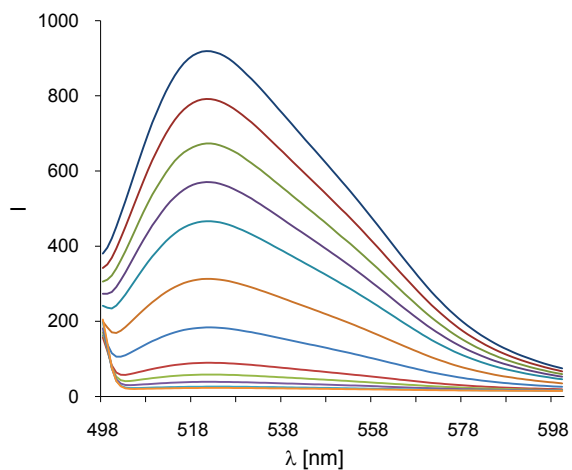
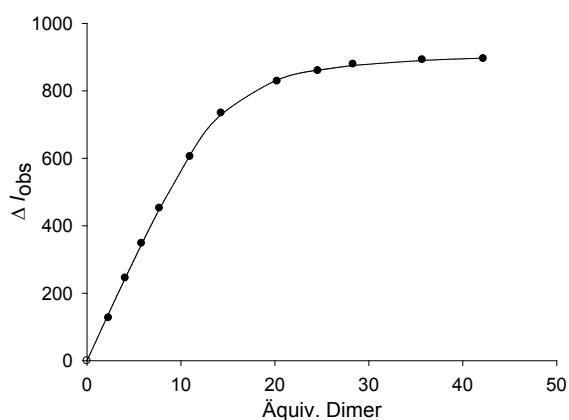
$$K_a = 1.3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ (19\%)}$$

Stöchiometrie = 6:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 55 mit 12 BP DNA

Rezeptor	Dimer 55	M (55) [g/mol]	2320.30
DNA	12 BP [Fl]-DNA	m (55) [mg]	0.678
T [°C]	25	V (55) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[55] ₀ [mol/L]	$2.92 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[55] [mol/L]	[55] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	918.3	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$4.58 \cdot 10^{-6}$	2.29	791.2	127.1	139.1	0.304	38.632
10	720	$8.14 \cdot 10^{-6}$	4.07	673.2	245.1	244.9	0.197	48.334
10	730	$1.16 \cdot 10^{-5}$	5.81	570.3	348.0	345.2	0.147	51.114
10	740	$1.54 \cdot 10^{-5}$	7.71	466.3	452.0	450.1	0.115	51.878
20	760	$2.20 \cdot 10^{-5}$	10.97	313.0	605.3	609.8	0.084	50.552
20	780	$2.86 \cdot 10^{-5}$	14.27	183.9	734.4	729.4	0.065	48.081
40	820	$4.05 \cdot 10^{-5}$	20.24	89.7	828.6	832.6	0.047	39.008
30	850	$4.92 \cdot 10^{-5}$	24.58	58.4	859.9	861.5	0.039	33.621
30	880	$5.66 \cdot 10^{-5}$	28.32	39.1	879.2	875.3	0.034	29.986
60	940	$7.14 \cdot 10^{-5}$	35.69	26.3	892.0	890.1	0.027	24.312
60	1000	$8.44 \cdot 10^{-5}$	42.19	22.9	895.4	897.1	0.023	20.730



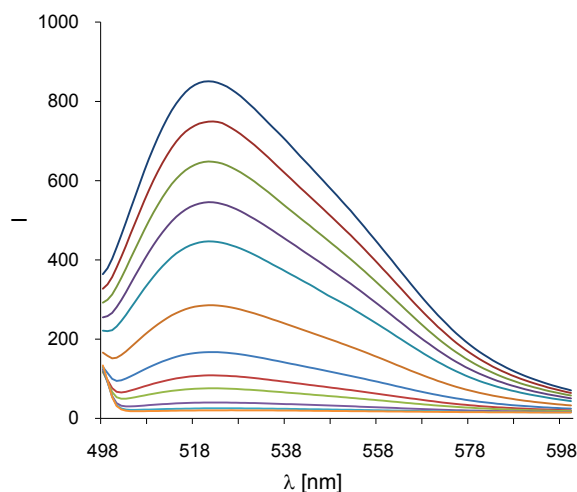
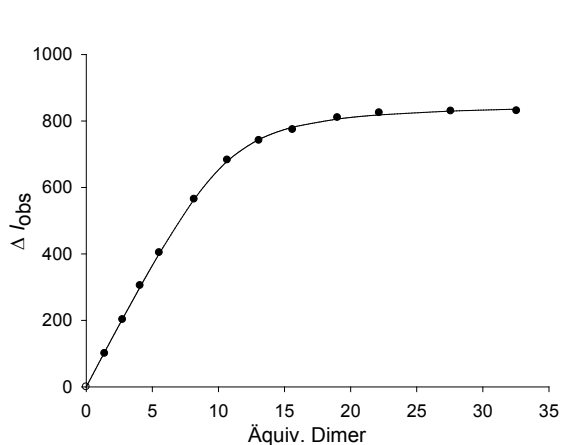
$$K_a = 6.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (7\%)}$$

Stöchiometrie = 14:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 79 mit 12 BP DNA

Rezeptor	Dimer 79	M (79) [g/mol]	2598.56
DNA	12 BP [Fl]-DNA	m (79) [mg]	0.579
T [°C]	25	V (79) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[79] ₀ [mol/L]	$2.23 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[79] [mol/L]	[79] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	850.0	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$2.79 \cdot 10^{-6}$	1.39	749.4	100.6	104.8	0.418	42.046
10	720	$5.50 \cdot 10^{-6}$	2.75	647.6	202.4	205.2	0.267	53.962
10	730	$8.15 \cdot 10^{-6}$	4.08	545.3	304.7	300.7	0.197	60.029
10	740	$1.11 \cdot 10^{-5}$	5.53	446.2	403.8	401.2	0.153	61.852
20	760	$1.63 \cdot 10^{-5}$	8.17	285.5	564.5	564.5	0.109	61.575
20	780	$2.14 \cdot 10^{-5}$	10.68	167.4	682.6	679.5	0.086	58.449
20	800	$2.61 \cdot 10^{-5}$	13.07	108.6	741.4	744.6	0.071	52.693
20	820	$3.12 \cdot 10^{-5}$	15.61	75.9	774.1	781.3	0.060	46.598
30	850	$3.80 \cdot 10^{-5}$	19.01	40.0	810.0	805.9	0.050	40.487
30	880	$4.43 \cdot 10^{-5}$	22.17	25.4	824.6	818.2	0.043	35.591
60	940	$5.52 \cdot 10^{-5}$	27.59	20.3	829.7	829.6	0.035	29.024
60	1000	$6.51 \cdot 10^{-5}$	32.56	19.2	830.8	835.5	0.030	24.755



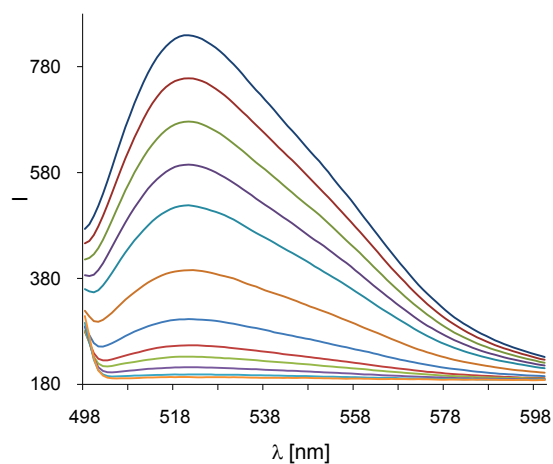
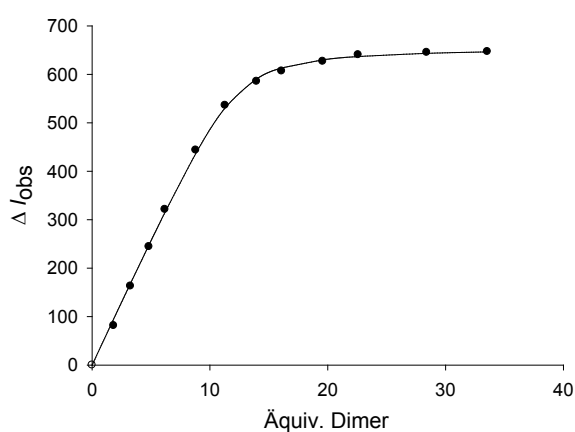
$$K_a = 8.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} (6\%)$$

Stöchiometrie = 11:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 80 mit 12 BP DNA

Rezeptor	Dimer 80	M (80) [g/mol]	2536.49
DNA	12 BP [Fl]-DNA	m (80) [mg]	0.595
T [°C]	25	V (80) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[80] ₀ [mol/L]	$2.35 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[80] [mol/L]	[80] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	839.3	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.67 \cdot 10^{-6}$	1.84	757.8	81.5	95.3	0.353	28.743
10	720	$6.53 \cdot 10^{-6}$	3.26	676.2	163.1	168.7	0.235	38.259
10	730	$9.66 \cdot 10^{-6}$	4.83	595.0	244.3	248.0	0.172	41.923
10	740	$1.24 \cdot 10^{-5}$	6.18	518.1	321.2	315.0	0.139	44.721
20	760	$1.76 \cdot 10^{-5}$	8.80	395.6	443.7	436.5	0.102	45.291
20	780	$2.26 \cdot 10^{-5}$	11.29	303.3	536.0	530.8	0.081	43.610
20	800	$2.79 \cdot 10^{-5}$	13.96	253.7	585.6	590.6	0.067	39.137
20	820	$3.22 \cdot 10^{-5}$	16.09	232.4	606.9	613.1	0.059	35.514
30	850	$3.92 \cdot 10^{-5}$	19.57	212.5	626.8	629.9	0.049	30.466
30	880	$4.52 \cdot 10^{-5}$	22.58	198.8	640.5	636.7	0.042	27.158
60	940	$5.68 \cdot 10^{-5}$	28.40	194.0	645.3	643.3	0.034	21.946
60	1000	$6.71 \cdot 10^{-5}$	33.55	192.4	646.9	646.3	0.029	18.724



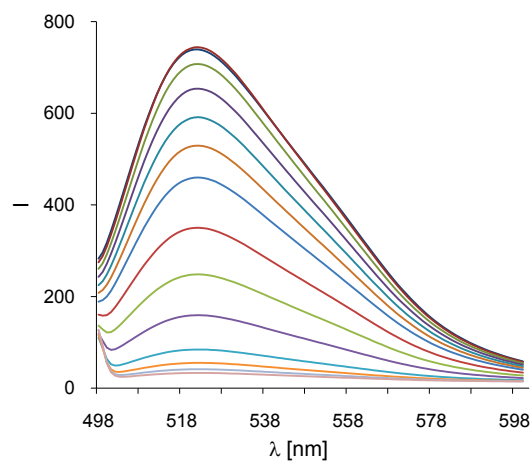
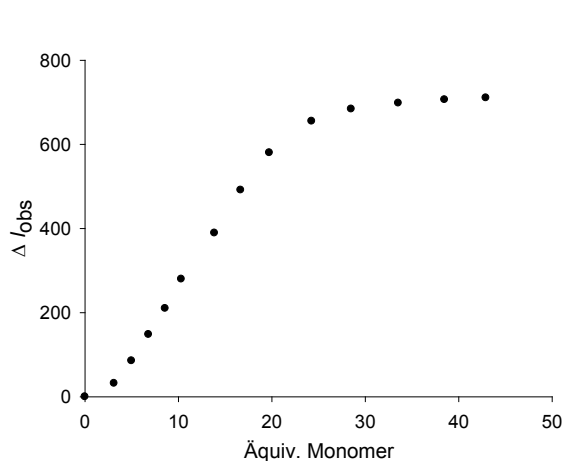
$$K_a = 1.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} (16\%)$$

Stöchiometrie = 12:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Monomer M1 mit 12 BP DNA

Rezeptor	Monomer M1	M (M1) [g/mol]	854.824
DNA	12 BP [Fl]-DNA	m (M1) [mg]	0.267
T [°C]	25	V (M1) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[M1] ₀ [mol/L]	3.12·10 ⁻⁴
		[DNA] ₀ [mol/L]	2.00·10 ⁻⁶

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[M1] [mol/L]	[M1] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	739.4	0.0	1.000	0.000
20	720	6.26·10 ⁻⁶	3.13	707.6	31.8	0.242	7.703
10	730	9.98·10 ⁻⁶	4.99	653.9	85.5	0.167	14.269
10	740	1.36·10 ⁻⁵	6.81	591.5	147.9	0.128	18.936
10	750	1.72·10 ⁻⁵	8.59	529.5	209.9	0.104	21.897
10	760	2.06·10 ⁻⁵	10.32	459.7	279.7	0.088	24.709
20	780	2.77·10 ⁻⁵	13.87	350.1	389.3	0.067	26.177
20	800	3.33·10 ⁻⁵	16.67	248.3	491.1	0.057	27.793
20	820	3.95·10 ⁻⁵	19.74	159.3	580.1	0.048	27.975
30	850	4.85·10 ⁻⁵	24.27	84.4	655.0	0.040	25.924
30	880	5.70·10 ⁻⁵	28.50	55.3	684.1	0.034	23.186
40	920	6.71·10 ⁻⁵	33.55	41.3	698.1	0.029	20.207
40	960	7.70·10 ⁻⁵	38.49	33.3	706.1	0.025	17.881
40	100	8.58·10 ⁻⁵	42.92	28.9	710.5	0.023	16.179



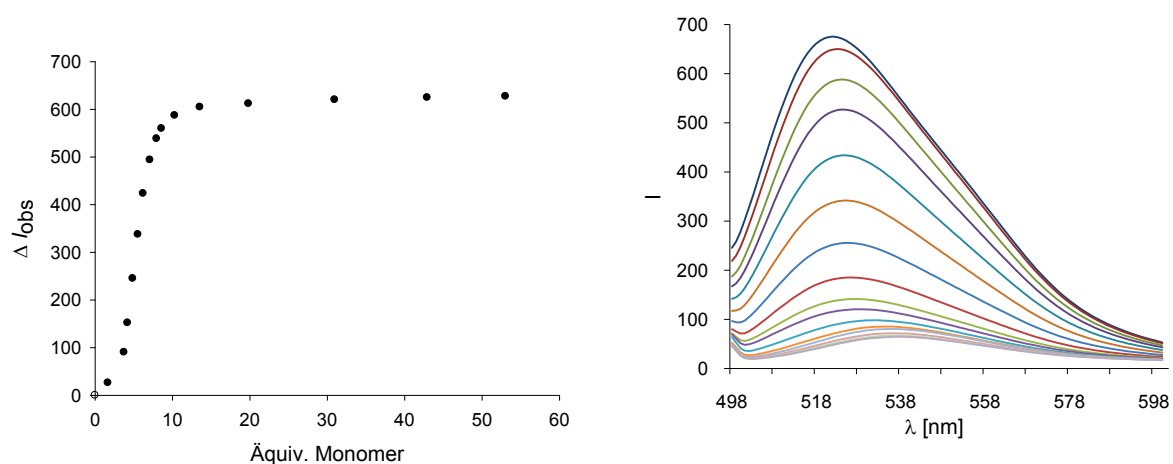
$$K_a = 4.7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ (60\%)}$$

Stöchiometrie = 18:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Monomer M7 mit 12 BP DNA

Rezeptor	Monomer M7	M (M7) [g/mol]	1022.94
DNA	12 BP [Fl]-DNA	m (M7) [mg]	0.572
T [°C]	25	V (M7) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[M7] ₀ [mol/L]	3.05·10 ⁻⁴
		[DNA] ₀ [mol/L]	2.00·10 ⁻⁶

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[M7] [mol/L]	[M7] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	675.6	0.0	1.000	0.000
10	710	3.32·10 ⁻⁶	1.66	649.5	26.1	0.376	9.811
10	720	7.49·10 ⁻⁶	3.74	585.3	90.3	0.211	19.041
5	725	8.40·10 ⁻⁶	4.20	523.6	152.0	0.192	29.246
5	730	9.75·10 ⁻⁶	4.87	430.4	245.2	0.170	41.740
5	735	1.11·10 ⁻⁵	5.55	338.2	337.4	0.153	51.547
5	740	1.24·10 ⁻⁵	6.21	252.1	423.5	0.139	58.734
5	745	1.41·10 ⁻⁵	7.09	181.7	493.9	0.124	61.067
5	750	1.59·10 ⁻⁵	7.95	137.3	538.3	0.112	60.114
5	755	1.72·10 ⁻⁵	8.60	115.8	559.8	0.104	58.325
10	765	2.06·10 ⁻⁵	10.29	88.5	587.1	0.089	52.018
20	785	2.71·10 ⁻⁵	13.55	71.0	604.6	0.069	41.565
40	825	3.96·10 ⁻⁵	19.82	63.7	611.9	0.048	29.391
80	905	6.19·10 ⁻⁵	30.96	55.6	620.0	0.031	19.400
100	1005	8.58·10 ⁻⁵	42.91	51.0	624.6	0.023	14.225
100	1105	1.06·10 ⁻⁴	53.02	48.3	627.3	0.019	11.612



$$K_a = 7.0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (78\%)}$$

Stöchiometrie = 8:1 (Rezeptor : DNA)

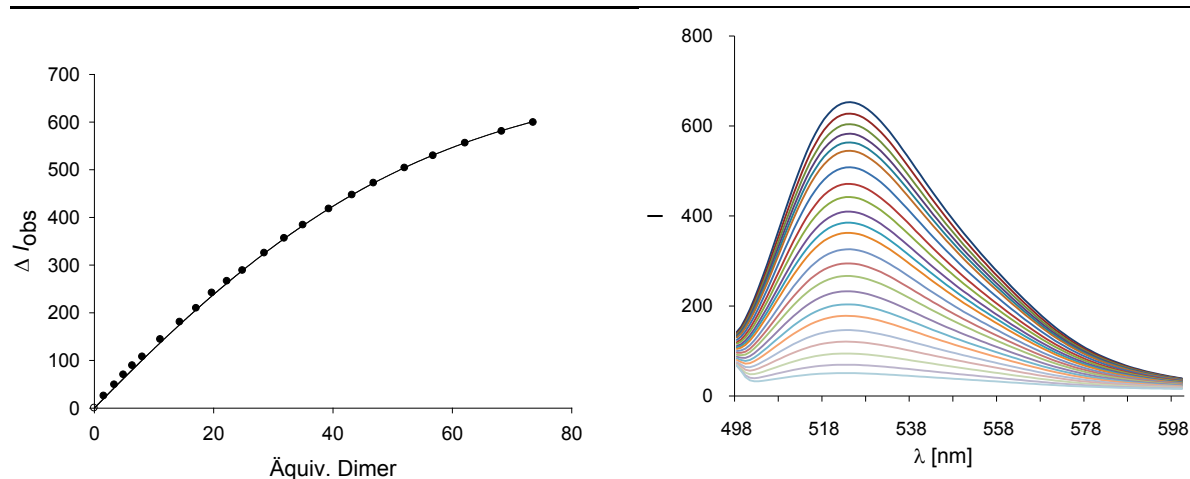
Fluoreszenztitration unter erhöhter Salzkonzentration

Fluoreszenztitration Dimer 1 mit 12 BP DNA

Rezeptor	Dimer 1	M (1) [g/mol]	2212.22
DNA	12 BP [Fl]-DNA	m (1) [mg]	0.641
T [°C]	25	V (1) [mL]	1.0
Lösungsmittel	2 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1 150 mM NaCl	[1] ₀ [mol/L]	2.90·10 ⁻⁴
		[DNA] ₀ [mol/L]	2.00·10 ⁻⁶

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[1] [mol/L]	[1] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	649.7	0.0	0.0	1.000	0.000
20	720	6.76·10 ⁻⁶	3.38	601.0	48.7	48.9	0.228	11.119
20	740	1.28·10 ⁻⁵	6.39	560.8	88.9	89.6	0.135	12.022
30	770	2.22·10 ⁻⁵	11.08	506.0	143.7	148.2	0.083	11.897
40	810	3.42·10 ⁻⁵	17.09	440.5	209.2	215.9	0.055	11.563
40	850	4.45·10 ⁻⁵	22.26	383.9	265.8	268.4	0.043	11.428
50	900	5.71·10 ⁻⁵	28.53	324.8	324.9	326.1	0.034	11.002
60	960	7.00·10 ⁻⁵	34.99	266.0	383.7	379.4	0.028	10.660
80	1040	8.64·10 ⁻⁵	43.22	203.1	446.6	439.9	0.023	10.099
100	1140	1.04·10 ⁻⁴	52.04	146.2	503.5	497.1	0.019	9.493
140	1280	1.24·10 ⁻⁴	62.17	94.1	555.6	554.5	0.016	8.796
200	1480	1.47·10 ⁻⁴	73.57	50.8	598.9	610.8	0.013	8.031

in der Tabelle ist nur jeder zweite gemessene Titrationsschritt angegeben



$$K_a = 4.0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} (15\%)$$

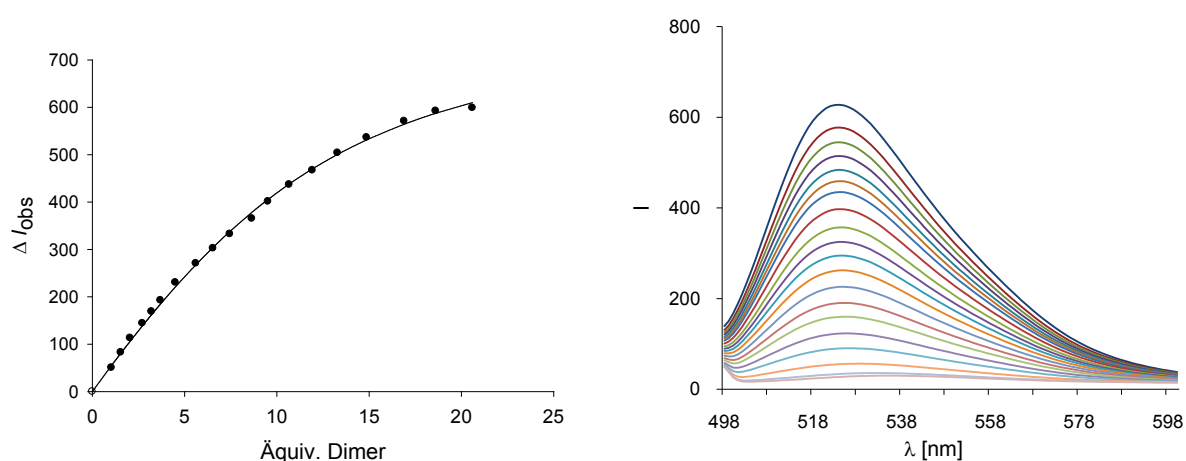
Stöchiometrie = 50:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration Dimer 7 mit 12 BP DNA

Rezeptor	Dimer 7	M (7) [g/mol]	1999.09
DNA	12 BP [Fl]-DNA	m (7) [mg]	0.436
T [°C]	25	V (7) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1 150 mM NaCl	[7] ₀ [mol/L]	2.18·10 ⁻⁴
		[DNA] ₀ [mol/L]	2.00·10 ⁻⁶

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[7] [mol/L]	[7] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	624.9	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	2.07·10 ⁻⁶	1.03	574.5	50.4	54.7	0.492	24.783
10	720	4.10·10 ⁻⁶	2.05	511.8	113.1	106.2	0.328	37.108
10	730	6.42·10 ⁻⁶	3.21	456.1	168.8	162.3	0.238	40.120
13	743	9.00·10 ⁻⁶	4.50	394.6	230.3	220.9	0.182	41.857
16	759	1.31·10 ⁻⁵	6.54	322.5	302.4	304.3	0.133	40.108
18	777	1.73·10 ⁻⁵	8.65	259.6	365.3	378.4	0.104	37.866
10	787	1.91·10 ⁻⁵	9.52	223.6	401.3	405.6	0.095	38.132
10	797	2.13·10 ⁻⁵	10.67	188.1	436.8	438.1	0.086	37.431
10	807	2.39·10 ⁻⁵	11.93	157.9	467.0	470.1	0.077	36.125
18	825	2.97·10 ⁻⁵	14.87	88.6	536.3	531.3	0.063	33.792
20	845	3.38·10 ⁻⁵	16.90	54.0	570.9	564.2	0.056	31.892
20	865	3.72·10 ⁻⁵	18.61	32.5	592.4	587.3	0.051	30.213
20	885	4.12·10 ⁻⁵	20.60	26.1	598.8	609.9	0.046	27.726

in der Tabelle sind nicht alle gemessenen Titrationsschritte angegeben



$$K_a = 1.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (12\%)}$$

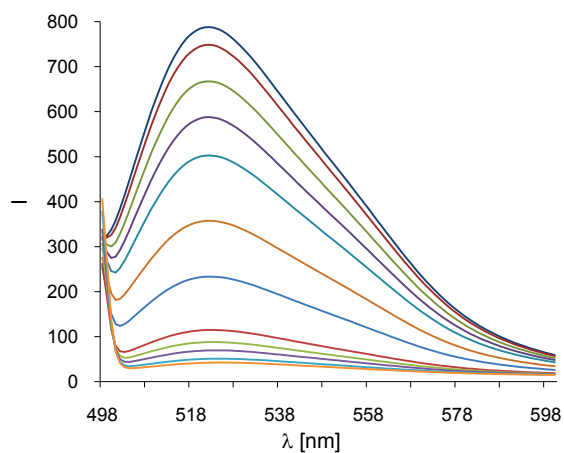
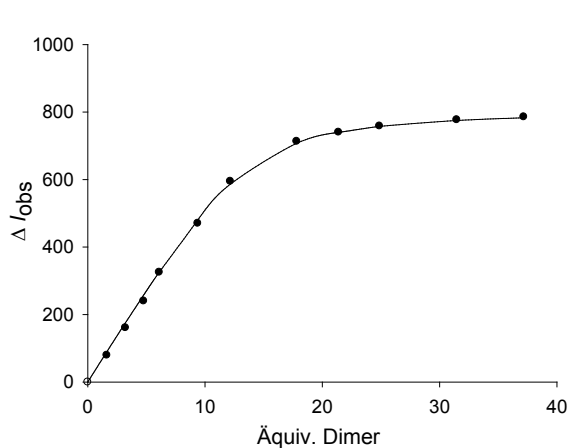
Stöchiometrie = 11:1 (Rezeptor : DNA)

5.4.1.2 Fluoreszenztitrationen mit 12 BP (GC) DNA

Fluoreszenztitration von Dimer 1 mit 12 BP (GC) DNA

Rezeptor	Dimer 1	M (1) [g/mol]	2212.22
DNA	12 BP (GC) [Fl]-DNA	m (1) [mg]	0.577
T [°C]	25	V (1) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[1] ₀ [mol/L]	$2.61 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[1] [mol/L]	[1] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	828.1	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.26 \cdot 10^{-6}$	1.63	748.8	79.3	89.9	0.380	30.163
10	720	$6.44 \cdot 10^{-6}$	3.22	667.4	160.6	176.0	0.237	38.066
10	730	$9.54 \cdot 10^{-6}$	4.77	588.0	240.1	258.0	0.173	41.609
10	740	$1.22 \cdot 10^{-5}$	6.10	502.8	325.3	326.0	0.141	45.834
20	760	$1.88 \cdot 10^{-5}$	9.38	357.6	470.4	480.7	0.096	45.306
20	780	$2.43 \cdot 10^{-5}$	12.16	233.3	594.7	586.6	0.076	45.187
40	820	$3.57 \cdot 10^{-5}$	17.82	114.9	713.2	707.8	0.053	37.905
30	850	$4.28 \cdot 10^{-5}$	21.39	87.9	740.2	740.0	0.045	33.058
30	880	$4.98 \cdot 10^{-5}$	24.88	69.5	758.6	757.5	0.039	29.312
60	940	$6.29 \cdot 10^{-5}$	31.47	50.9	777.2	775.0	0.031	23.938
60	1000	$7.44 \cdot 10^{-5}$	37.18	42.3	785.8	783.1	0.026	20.584



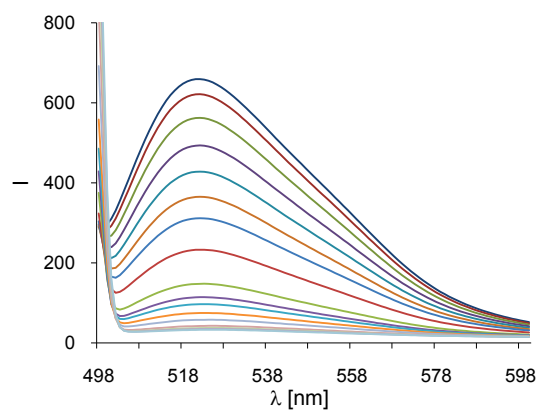
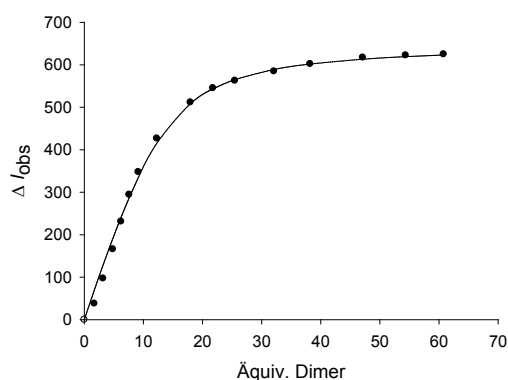
$$K_a = 5.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} (17\%)$$

Stöchiometrie = 14:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 2 mit 12 BP (GC) DNA

Rezeptor	Dimer 2	M (2) [g/mol]	2240.27
DNA	12 BP (GC) [Fl]-DNA	m (2) [mg]	0.609
T [°C]	25	V (2) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[2] ₀ [mol/L]	$2.72 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[2] [mol/L]	[2] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	659.4	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.44 \cdot 10^{-6}$	1.72	621.5	37.9	70.8	0.368	13.931
10	720	$6.38 \cdot 10^{-6}$	3.19	562.4	97.0	129.1	0.239	23.147
10	730	$9.66 \cdot 10^{-6}$	4.83	493.5	165.9	191.4	0.171	28.447
10	740	$1.25 \cdot 10^{-5}$	6.23	428.2	231.2	241.7	0.138	31.956
10	750	$1.52 \cdot 10^{-5}$	7.61	365.2	294.2	287.8	0.116	34.176
10	760	$1.83 \cdot 10^{-5}$	9.14	311.7	347.7	335.0	0.099	34.281
20	780	$2.46 \cdot 10^{-5}$	12.28	232.9	426.5	415.9	0.075	32.105
40	820	$3.59 \cdot 10^{-5}$	17.96	147.8	511.6	508.7	0.053	26.985
30	850	$4.35 \cdot 10^{-5}$	21.77	114.3	545.1	543.5	0.044	23.940
30	880	$5.10 \cdot 10^{-5}$	25.49	96.8	562.6	565.4	0.038	21.242
60	940	$6.42 \cdot 10^{-5}$	32.11	74.8	584.6	589.0	0.030	17.657
60	1000	$7.64 \cdot 10^{-5}$	38.21	57.5	601.9	601.8	0.026	15.351
100	1100	$9.42 \cdot 10^{-5}$	47.11	42.3	617.1	613.3	0.021	12.827
100	1200	$1.09 \cdot 10^{-4}$	54.37	37.2	622.2	619.2	0.018	11.237
100	1300	$1.22 \cdot 10^{-4}$	60.80	34.7	624.7	623.1	0.016	10.109



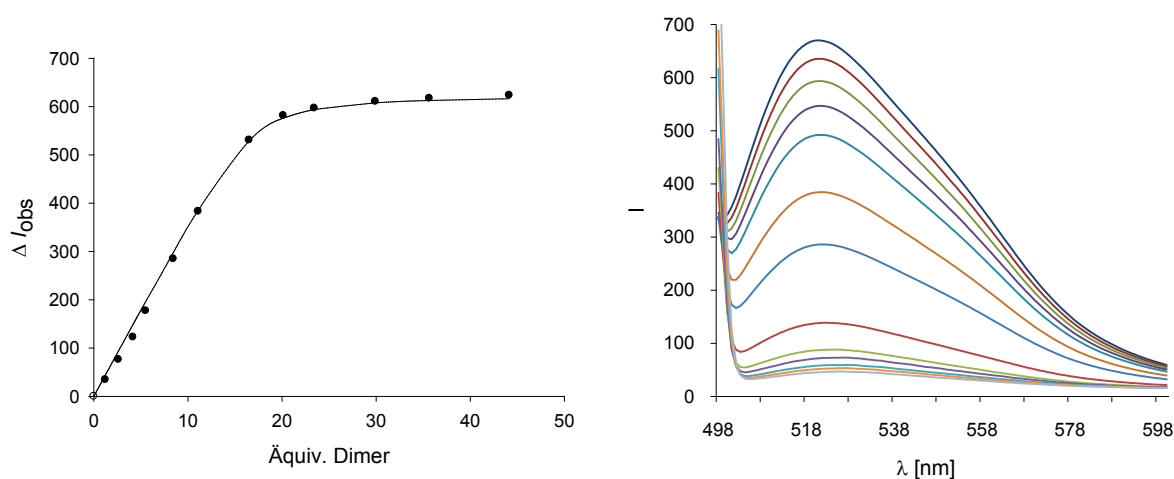
$$K_a = 2.4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (16\%)}$$

Stöchiometrie = 13:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 3 mit 12 BP (GC) DNA

Rezeptor	Dimer 3	M (3) [g/mol]	2268.32
DNA	12 BP (GC) [Fl]-DNA	m (3) [mg]	0.591
T [°C]	25	V (3) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[3] ₀ [mol/L]	$2.61 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[3] [mol/L]	[3] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	669.4	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$2.44 \cdot 10^{-6}$	1.22	634.9	34.5	43.8	0.450	15.535
10	720	$5.24 \cdot 10^{-6}$	2.62	593.1	76.3	93.8	0.276	21.099
10	730	$8.35 \cdot 10^{-6}$	4.18	546.7	122.7	149.2	0.193	23.702
10	740	$1.10 \cdot 10^{-5}$	5.51	492.2	177.2	196.2	0.154	27.217
20	760	$1.69 \cdot 10^{-5}$	8.45	384.6	284.8	298.1	0.106	30.127
20	780	$2.22 \cdot 10^{-5}$	11.09	286.3	383.1	385.3	0.083	31.686
40	820	$3.30 \cdot 10^{-5}$	16.51	138.7	530.7	529.5	0.057	30.309
30	850	$4.03 \cdot 10^{-5}$	20.15	87.9	581.5	576.1	0.047	27.497
30	880	$4.69 \cdot 10^{-5}$	23.43	72.6	596.8	593.9	0.041	24.433
60	940	$5.98 \cdot 10^{-5}$	29.92	58.7	610.7	607.7	0.032	19.754
60	1000	$7.13 \cdot 10^{-5}$	35.66	52.1	617.3	612.6	0.027	16.835
100	1100	$8.83 \cdot 10^{-5}$	44.15	46.0	623.4	616.3	0.022	13.807



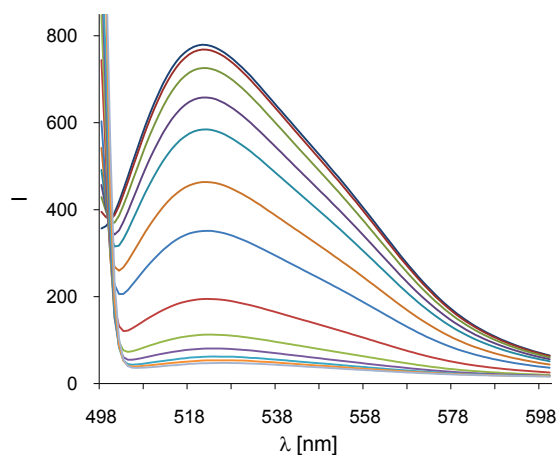
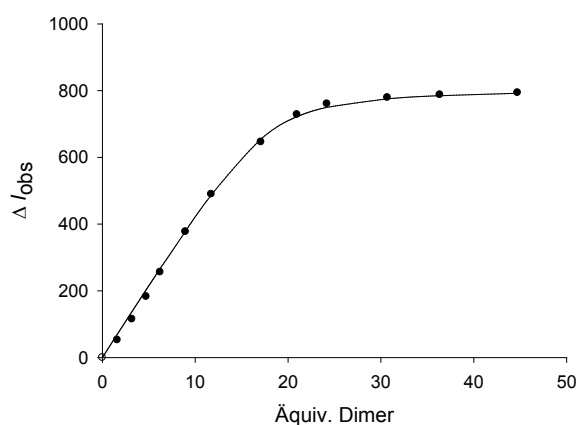
$$K_a = 1.32 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (28\%)}$$

Stöchiometrie = 17:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration Dimer 4 mit 12 BP (GC) DNA

Rezeptor	Dimer 4	M (4) [g/mol]	2296.38
DNA	12 BP (GC) [Fl]-DNA	m (4) [mg]	0.600
T [°C]	25	V (4) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[4] ₀ [mol/L]	$2.61 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[4] [mol/L]	[4] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	840.8	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.24 \cdot 10^{-6}$	1.62	788.2	52.6	70.2	0.382	20.086
10	720	$6.39 \cdot 10^{-6}$	3.20	725.8	115.0	138.3	0.238	27.400
10	730	$9.47 \cdot 10^{-6}$	4.74	658.2	182.6	204.0	0.174	31.832
10	740	$1.25 \cdot 10^{-5}$	6.24	584.7	256.1	267.5	0.138	35.374
20	760	$1.79 \cdot 10^{-5}$	8.96	463.7	377.1	379.6	0.100	37.844
20	780	$2.35 \cdot 10^{-5}$	11.74	351.4	489.4	487.6	0.078	38.408
40	820	$3.42 \cdot 10^{-5}$	17.09	194.6	646.2	655.2	0.055	35.727
30	850	$4.19 \cdot 10^{-5}$	20.97	112.4	728.4	722.3	0.046	33.150
30	880	$4.84 \cdot 10^{-5}$	24.19	80.5	760.3	750.3	0.040	30.179
60	940	$6.14 \cdot 10^{-5}$	30.70	61.6	779.1	775.5	0.032	24.576
60	1000	$7.27 \cdot 10^{-5}$	36.35	53.2	787.5	785.0	0.027	21.082
100	1100	$8.94 \cdot 10^{-5}$	44.71	46.8	793.9	792.3	0.022	17.367



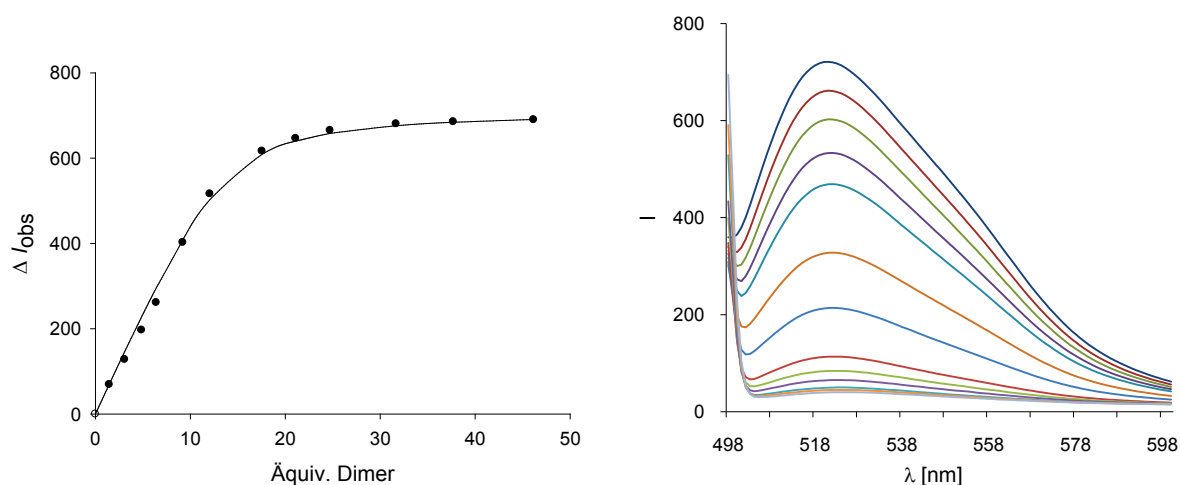
$$K_a = 8.4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (26\%)}$$

Stöchiometrie = 18:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 5 mit 12 BP (GC) DNA

Rezeptor	Dimer 5	M (5) [g/mol]	2470.30
DNA	12 BP (GC) [Fl]-DNA	m (5) [mg]	0.665
T [°C]	25	V (5) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[5] ₀ [mol/L]	$2.69 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[5] [mol/L]	[5] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	730.1	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$2.91 \cdot 10^{-6}$	1.46	661.1	69.0	69.9	0.407	28.092
10	720	$6.17 \cdot 10^{-6}$	3.08	602.4	127.8	146.4	0.245	31.297
10	730	$9.73 \cdot 10^{-6}$	4.87	533.5	196.6	227.9	0.171	33.528
10	740	$1.28 \cdot 10^{-5}$	6.41	469.1	261.1	295.8	0.135	35.236
20	760	$1.84 \cdot 10^{-5}$	9.21	327.9	402.2	408.5	0.098	39.399
20	780	$2.41 \cdot 10^{-5}$	12.06	214.1	516.1	502.7	0.077	39.508
40	820	$3.51 \cdot 10^{-5}$	17.56	113.7	616.5	608.9	0.054	33.222
30	850	$4.22 \cdot 10^{-5}$	21.10	84.1	646.1	640.0	0.045	29.229
30	880	$4.94 \cdot 10^{-5}$	24.72	65.3	664.8	658.0	0.039	25.847
60	940	$6.34 \cdot 10^{-5}$	31.68	49.9	680.3	676.0	0.031	20.817
60	1000	$7.54 \cdot 10^{-5}$	37.70	44.9	685.2	684.1	0.026	17.707
100	1100	$9.23 \cdot 10^{-5}$	46.16	40.1	690.0	690.8	0.021	14.632



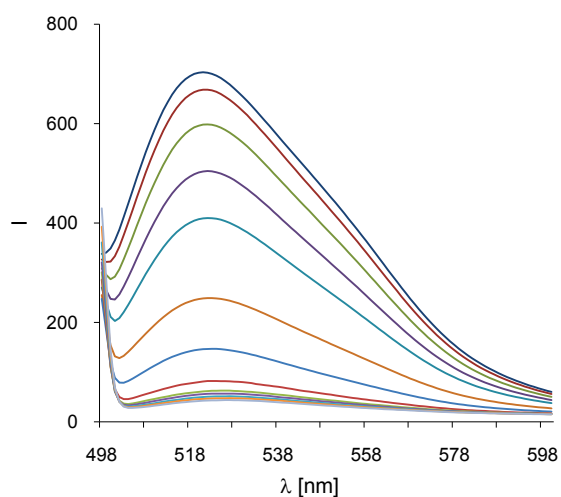
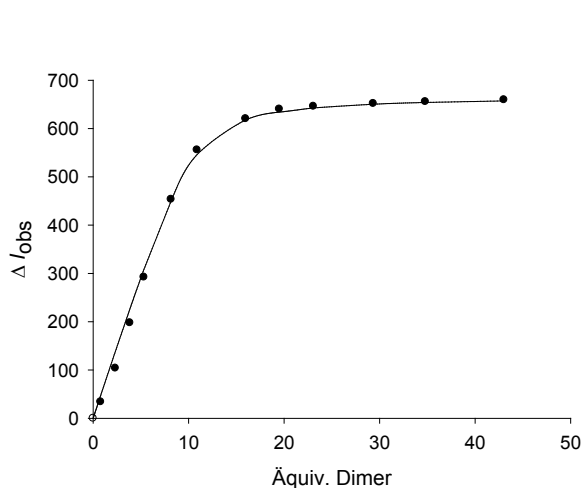
$$K_a = 5.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (26\%)}$$

Stöchiometrie = 14:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 6 mit 12 BP (GC) DNA

Rezeptor	Dimer 6	M (6) [g/mol]	2484.32
DNA	12 BP (GC) [Fl]-DNA	m (6) [mg]	0.634
T [°C]	25	V (6) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1), pH 7.1	[6] ₀ [mol/L]	$2.55 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[6] [mol/L]	[6] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	702.4	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$1.58 \cdot 10^{-6}$	0.79	668.4	33.9	47.3	0.559	18.968
10	720	$4.68 \cdot 10^{-6}$	2.34	598.6	103.7	139.0	0.300	31.082
10	730	$7.70 \cdot 10^{-6}$	3.85	504.6	197.7	226.4	0.206	40.779
10	740	$1.07 \cdot 10^{-5}$	5.32	410.1	292.3	308.6	0.158	46.210
20	760	$1.63 \cdot 10^{-5}$	8.17	249.0	453.3	450.3	0.109	49.422
20	780	$2.18 \cdot 10^{-5}$	10.89	146.8	555.6	546.2	0.084	46.723
40	820	$3.19 \cdot 10^{-5}$	15.97	82.1	620.2	618.0	0.059	36.544
30	850	$3.90 \cdot 10^{-5}$	19.50	62.1	640.3	634.2	0.049	31.230
30	880	$4.62 \cdot 10^{-5}$	23.08	56.4	645.9	642.7	0.042	26.823
60	940	$5.87 \cdot 10^{-5}$	29.34	50.6	651.8	650.4	0.033	21.481
60	1000	$6.96 \cdot 10^{-5}$	34.79	46.8	655.5	654.0	0.028	18.318
100	1100	$8.60 \cdot 10^{-5}$	43.02	42.9	659.5	657.3	0.023	14.982



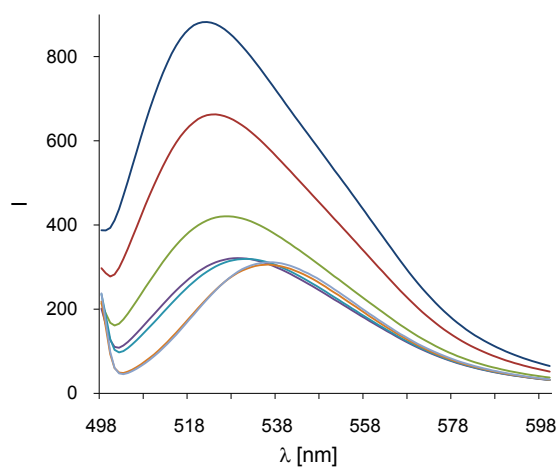
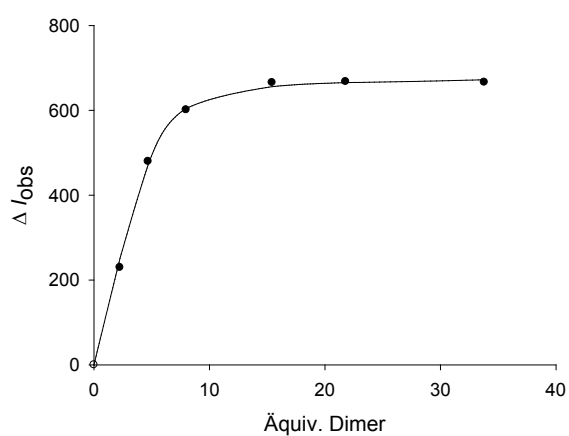
$$K_a = 1.0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (29\%)}$$

Stöchiometrie = 11:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 7 mit 12 BP (GC) DNA

Rezeptor	Dimer 7	M (7) [g/mol]	1999.09
DNA	12 BP (GC) [Fl]-DNA	m (7) [mg]	0.645
T [°C]	25	V (7) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[7] ₀ [mol/L]	$3.23 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[7] [mol/L]	[7] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	890.3	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$4.52 \cdot 10^{-6}$	2.26	660.7	229.6	251.2	0.307	70.472
10	720	$9.39 \cdot 10^{-6}$	4.69	410.6	479.7	471.6	0.176	84.247
10	730	$1.60 \cdot 10^{-5}$	7.98	289.0	601.3	604.5	0.111	66.949
10	740	$3.08 \cdot 10^{-5}$	15.42	225.0	665.3	655.9	0.061	40.520
20	760	$4.36 \cdot 10^{-5}$	21.79	222.7	667.6	665.5	0.044	29.295
20	780	$6.76 \cdot 10^{-5}$	33.79	224.1	666.2	672.1	0.029	19.147



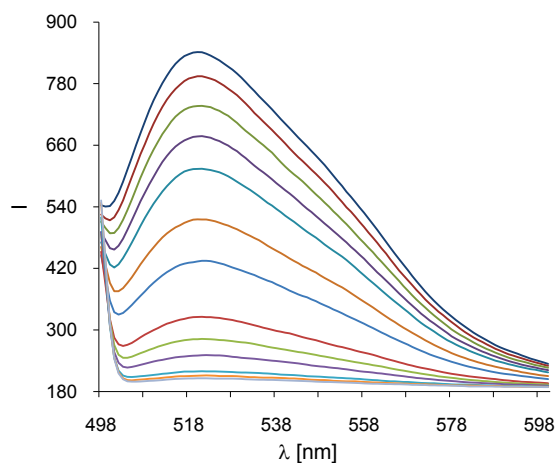
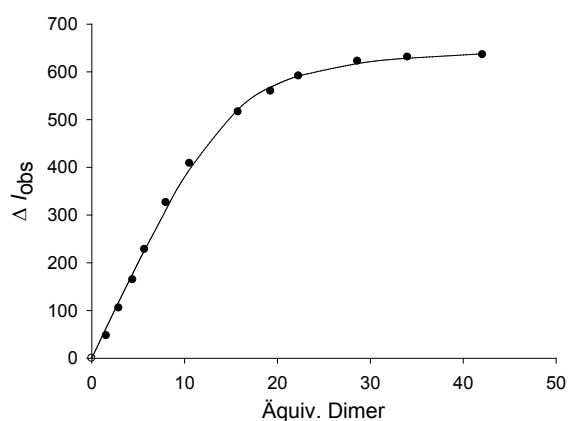
$$K_a = 1.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (19\%)}$$

Stöchiometrie = 6:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 55 mit 12 BP (GC) DNA

Rezeptor	Dimer 55	M (55) [g/mol]	2320.30
DNA	12 BP (GC) [Fl]-DNA	m (55) [mg]	0.566
T [°C]	25	V (55) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[55] ₀ [mol/L]	$2.44 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[55] [mol/L]	[55] / [DNA]	I _{520 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	841.6	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.14 \cdot 10^{-6}$	1.57	794.3	47.3	64.3	0.389	18.396
10	720	$5.83 \cdot 10^{-6}$	2.91	736.4	105.2	118.4	0.256	26.883
10	730	$8.82 \cdot 10^{-6}$	4.41	677.2	164.4	177.6	0.185	30.384
10	740	$1.14 \cdot 10^{-5}$	5.69	613.7	227.9	226.8	0.149	34.063
20	760	$1.60 \cdot 10^{-5}$	7.99	515.5	326.1	311.4	0.111	36.254
20	780	$1.11 \cdot 10^{-5}$	10.54	433.4	408.2	395.8	0.087	35.365
40	820	$3.15 \cdot 10^{-5}$	15.77	325.4	516.2	521.8	0.060	30.789
30	850	$3.85 \cdot 10^{-5}$	19.27	282.0	559.6	568.1	0.049	27.612
30	880	$4.46 \cdot 10^{-5}$	22.28	250.2	591.4	591.6	0.043	25.405
60	940	$5.73 \cdot 10^{-5}$	28.63	219.2	622.4	617.5	0.034	21.008
60	1000	$6.80 \cdot 10^{-5}$	34.01	210.8	630.8	628.6	0.029	18.019
100	1100	$8.42 \cdot 10^{-5}$	42.09	205.7	635.9	637.9	0.023	14.758



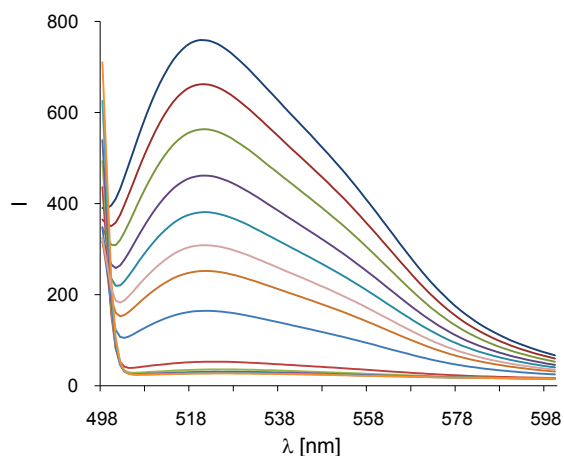
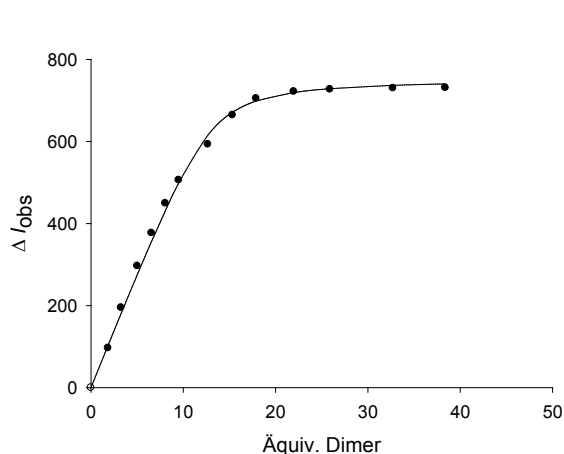
$$K_a = 4.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (20\%)}$$

Stöchiometrie = 15:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 79 mit 12 BP (GC) DNA

Rezeptor	Dimer 79	M (79) [g/mol]	2598.56
DNA	12 BP (GC) [Fl]-DNA	m (79) [mg]	0.685
T [°C]	25	V (79) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[79] ₀ [mol/L]	$2.64 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[79] [mol/L]	[79] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	757.7	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.71 \cdot 10^{-6}$	1.86	661.1	96.6	103.4	0.350	33.819
10	720	$6.53 \cdot 10^{-6}$	3.26	562.8	194.9	180.9	0.234	45.703
10	730	$1.01 \cdot 10^{-5}$	5.03	461.1	296.6	276.2	0.166	49.182
10	740	$1.31 \cdot 10^{-5}$	6.56	381.0	376.7	356.4	0.132	49.826
10	750	$1.61 \cdot 10^{-5}$	8.05	308.4	449.3	431.3	0.110	49.627
10	760	$1.90 \cdot 10^{-5}$	9.51	251.9	505.8	499.2	0.095	48.118
20	780	$2.53 \cdot 10^{-5}$	12.67	164.5	593.2	615.6	0.073	43.395
20	800	$3.07 \cdot 10^{-5}$	15.34	93.3	664.4	671.6	0.061	40.653
20	820	$3.58 \cdot 10^{-5}$	17.90	52.7	705.0	698.7	0.053	37.303
30	850	$4.39 \cdot 10^{-5}$	21.97	35.9	721.8	719.1	0.044	31.427
30	880	$5.18 \cdot 10^{-5}$	25.89	30.7	727.0	728.6	0.037	27.036
40	920	$6.54 \cdot 10^{-5}$	32.72	27.9	729.8	736.8	0.030	21.646
80	1000	$7.68 \cdot 10^{-5}$	38.40	26.9	730.8	740.4	0.025	18.548



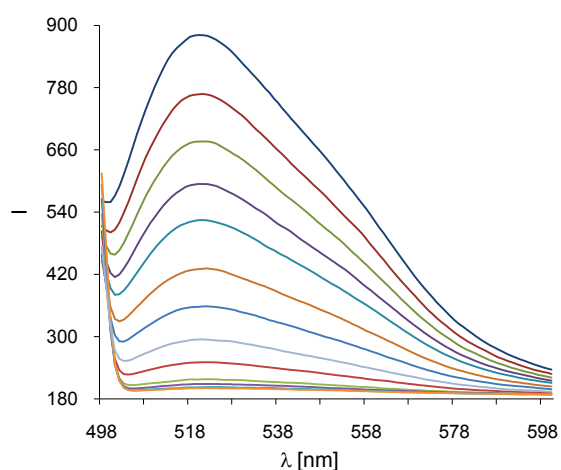
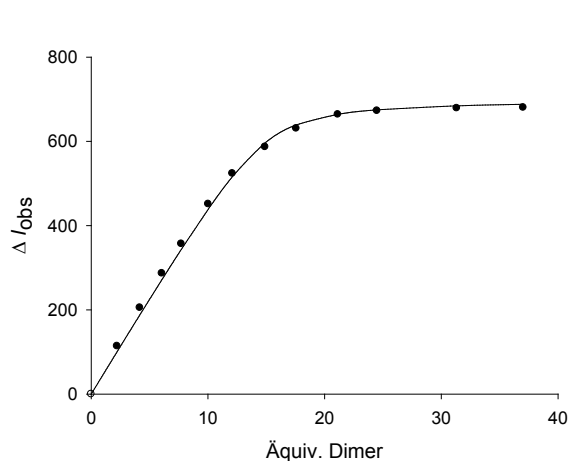
$$K_a = 1.1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (26\%)}$$

Stöchiometrie = 13:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 80 mit 12 BP (GC) DNA

Rezeptor	Dimer 80	M (80) [g/mol]	2536.49
DNA	12 BP (GC) [Fl]-DNA	m (80) [mg]	0.661
T [°C]	25	V (80) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[80] ₀ [mol/L]	$2.61 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[80] [mol/L]	[80] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	881.2	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$4.44 \cdot 10^{-6}$	2.22	767.3	113.9	100.6	0.311	35.387
10	720	$8.34 \cdot 10^{-6}$	4.17	676.1	205.1	188.2	0.193	39.663
10	730	$1.21 \cdot 10^{-5}$	6.06	594.4	286.8	272.0	0.142	40.595
10	740	$1.54 \cdot 10^{-5}$	7.72	524.5	356.7	343.6	0.115	40.900
20	760	$2.01 \cdot 10^{-5}$	10.04	430.1	451.1	439.3	0.091	40.870
20	780	$2.42 \cdot 10^{-5}$	12.10	357.5	523.7	516.2	0.076	39.980
20	800	$2.98 \cdot 10^{-5}$	14.90	294.5	586.7	596.4	0.063	36.896
20	820	$3.52 \cdot 10^{-5}$	17.57	250.6	630.6	639.1	0.054	33.950
30	850	$4.23 \cdot 10^{-5}$	21.14	217.3	663.9	664.3	0.045	29.982
30	880	$4.90 \cdot 10^{-5}$	24.49	208.6	672.6	674.8	0.039	26.383
60	940	$6.27 \cdot 10^{-5}$	31.33	202.4	678.8	684.4	0.031	20.997
60	1000	$7.40 \cdot 10^{-5}$	37.02	200.8	680.4	688.1	0.026	17.897



$$K_a = 1.4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (29\%)}$$

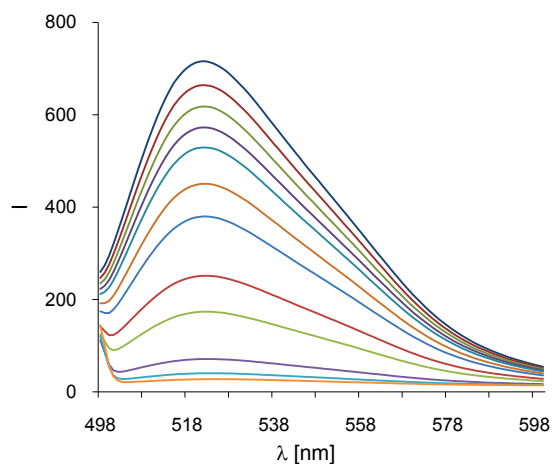
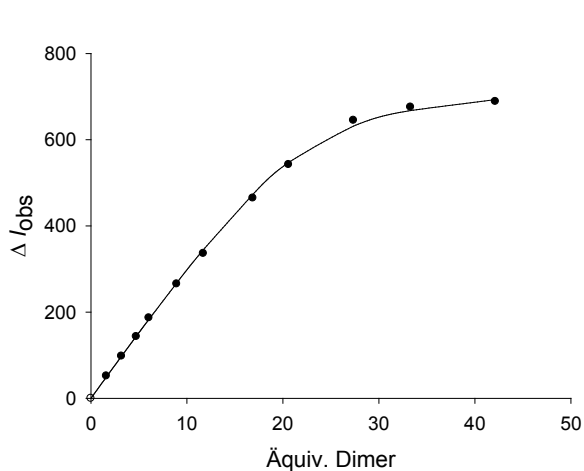
Stöchiometrie = 15:1 (Rezeptor : DNA)

5.4.1.3 Fluoreszenztitrationen mit 12 BP (AT) DNA

Fluoreszenztitration von Dimer 1 mit 12 BP (AT) DNA

Rezeptor	Dimer 1	M (1) [g/mol]	2212.22
DNA	12 BP (AT) [Fl]-DNA	m (1) [mg]	0.566
T [°C]	25	V (1) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[1] ₀ [mol/L]	$2.56 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[1] [mol/L]	[1] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	715.8	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.23 \cdot 10^{-6}$	1.62	664.0	51.8	49.8	0.382	19.796
10	720	$6.39 \cdot 10^{-6}$	3.19	618.0	97.8	97.9	0.238	23.324
10	730	$9.46 \cdot 10^{-6}$	4.73	572.6	143.2	144.3	0.174	24.988
10	740	$1.21 \cdot 10^{-5}$	6.05	529.3	186.5	183.5	0.142	26.472
20	760	$1.79 \cdot 10^{-5}$	8.95	450.6	265.2	268.0	0.101	26.661
20	780	$2.34 \cdot 10^{-5}$	11.71	379.7	336.1	345.0	0.079	26.435
40	820	$3.38 \cdot 10^{-5}$	16.88	251.3	464.5	473.5	0.056	25.980
30	850	$4.12 \cdot 10^{-5}$	20.61	173.6	542.2	547.3	0.046	25.095
60	910	$5.47 \cdot 10^{-5}$	27.36	71.0	644.8	631.6	0.035	22.740
60	970	$6.66 \cdot 10^{-5}$	33.31	40.2	675.6	667.7	0.029	19.693
100	1700	$8.43 \cdot 10^{-5}$	42.14	27.3	688.5	693.2	0.023	15.960



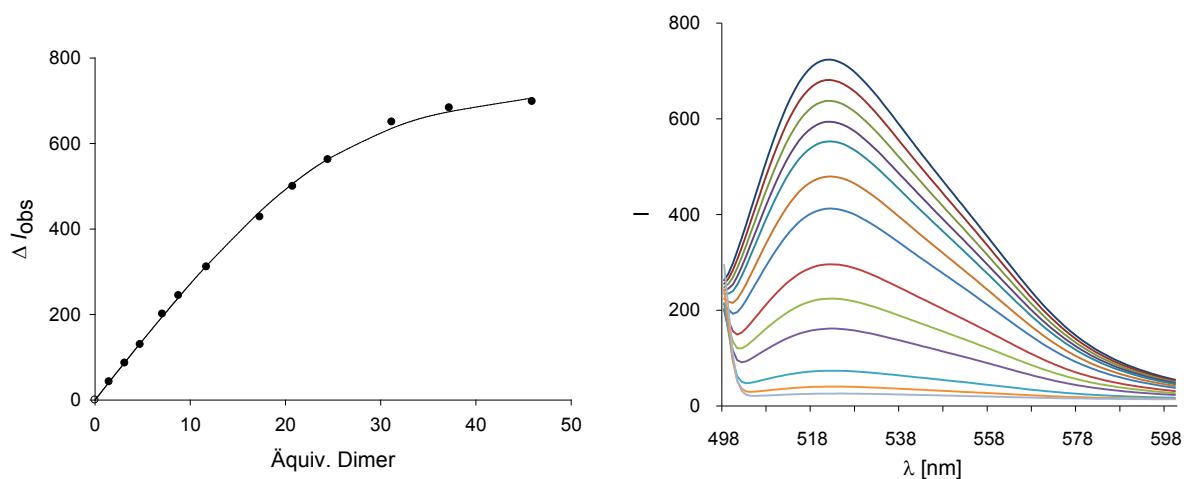
$$K_a = 3.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (20\%)}$$

Stöchiometrie = 22:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 2 mit 12 BP (AT) DNA

Rezeptor	Dimer 2	M (2) [g/mol]	2240.27
DNA	12 BP (AT) [Fl]-DNA	m (2) [mg]	0.599
T [°C]	25	V (2) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[2] ₀ [mol/L]	$2.67 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[2] [mol/L]	[2] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	723.9	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$2.96 \cdot 10^{-6}$	1.48	681.3	42.6	41.9	0.403	17.172
10	720	$6.27 \cdot 10^{-6}$	3.13	637.6	86.3	88.1	0.242	20.879
10	730	$9.49 \cdot 10^{-6}$	4.75	594.2	129.7	132.5	0.174	22.576
10	740	$1.42 \cdot 10^{-5}$	7.09	522.9	201.0	195.7	0.124	24.847
20	760	$1.76 \cdot 10^{-5}$	8.79	479.7	244.2	240.4	0.102	24.937
20	780	$2.34 \cdot 10^{-5}$	11.71	412.7	311.2	313.9	0.079	24.485
40	820	$3.46 \cdot 10^{-5}$	17.32	296.1	427.8	440.7	0.055	23.356
30	850	$4.16 \cdot 10^{-5}$	20.78	224.3	499.6	506.3	0.046	22.943
30	880	$4.89 \cdot 10^{-5}$	24.47	161.8	562.1	563.6	0.039	22.073
60	940	$6.23 \cdot 10^{-5}$	31.17	73.7	650.2	635.6	0.031	20.213
60	1000	$7.44 \cdot 10^{-5}$	37.20	40.5	683.4	674.4	0.026	17.888
100	1100	$9.18 \cdot 10^{-5}$	45.92	25.9	698.0	706.5	0.021	14.876



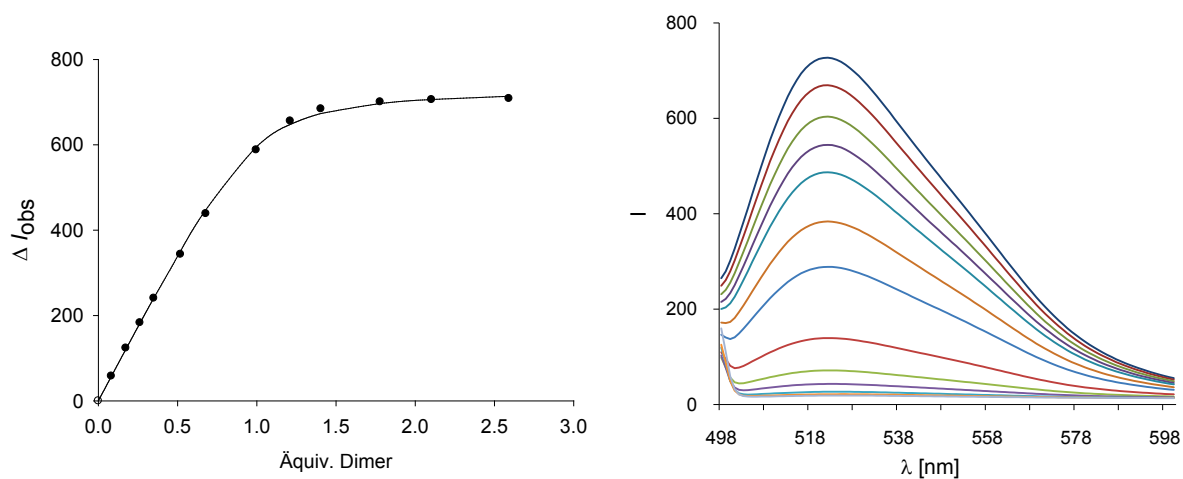
$$K_a = 2.0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (19\%)}$$

Stöchiometrie = 25:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 3 mit 12 BP (AT) DNA

Rezeptor	Dimer 3	M (3) [g/mol]	2268.32
DNA	12 BP (AT) [Fl]-DNA	m (3) [mg]	0.626
T [°C]	25	V (3) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[3] ₀ [mol/L]	2.76·10 ⁻⁴
		[DNA] ₀ [mol/L]	2.00·10 ⁻⁶

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[3] [mol/L]	[3] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	727.3	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	3.04·10 ⁻⁶	1.52	669.4	57.9	57.5	0.397	22.988
10	720	6.43·10 ⁻⁶	3.21	603.7	123.6	121.1	0.237	29.331
10	730	9.74·10 ⁻⁶	4.87	544.4	182.9	182.4	0.170	31.171
10	740	1.30·10 ⁻⁵	6.48	486.9	240.4	241.3	0.134	32.134
20	760	1.92·10 ⁻⁵	9.59	383.9	343.4	351.1	0.094	32.415
20	780	2.51·10 ⁻⁵	12.56	288.7	438.6	448.1	0.074	32.339
40	820	3.69·10 ⁻⁵	18.44	139.4	587.9	594.8	0.051	30.247
30	850	4.48·10 ⁻⁵	22.42	71.5	655.8	647.9	0.043	28.006
30	880	5.20·10 ⁻⁵	26.00	43.2	684.1	673.4	0.037	25.342
60	940	6.58·10 ⁻⁵	32.91	26.7	700.6	696.7	0.029	20.661
60	1000	7.78·10 ⁻⁵	38.91	21.5	705.8	706.2	0.025	17.686
100	1100	9.59·10 ⁻⁵	47.95	18.8	708.5	713.9	0.020	14.473



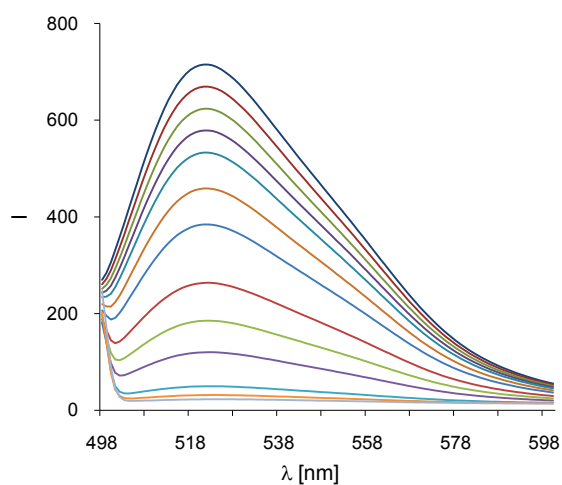
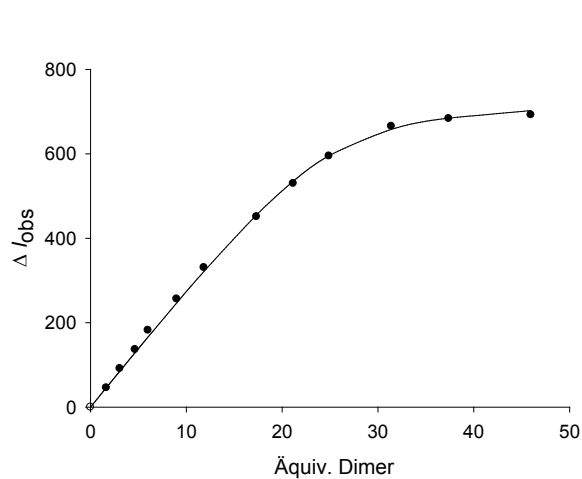
$$K_a = 6.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (13\%)}$$

Stöchiometrie = 19:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 4 mit 12 BP (AT) DNA

Rezeptor	Dimer 4	M (4) [g/mol]	2296.38
DNA	12 BP (AT) [Fl]-DNA	m (4) [mg]	0.610
T [°C]	25	V (4) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[4] ₀ [mol/L]	2.66·10 ⁻⁴
		[DNA] ₀ [mol/L]	2.00·10 ⁻⁶

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[4] [mol/L]	[4] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	715.0	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	3.32·10 ⁻⁶	1.66	669.3	45.7	46.3	0.376	17.196
10	720	6.15·10 ⁻⁶	3.07	623.7	91.3	85.6	0.245	22.408
10	730	9.31·10 ⁻⁶	4.66	578.7	136.3	129.3	0.177	24.095
10	740	1.20·10 ⁻⁵	6.01	533.0	182.0	166.3	0.143	25.963
20	760	1.80·10 ⁻⁵	9.00	458.8	256.2	246.9	0.100	25.625
20	780	2.37·10 ⁻⁵	11.85	384.4	330.6	321.7	0.078	25.731
40	820	3.47·10 ⁻⁵	17.33	263.9	451.1	455.6	0.055	24.607
30	850	4.23·10 ⁻⁵	21.17	185.4	529.6	535.4	0.045	23.892
30	880	4.98·10 ⁻⁵	24.89	120.2	594.8	595.8	0.039	22.972
60	940	6.28·10 ⁻⁵	31.40	49.8	665.2	658.0	0.031	20.530
60	1000	7.48·10 ⁻⁵	37.39	31.6	683.4	684.5	0.026	17.802
100	1100	9.19·10 ⁻⁵	45.96	22.9	692.1	702.5	0.021	14.737



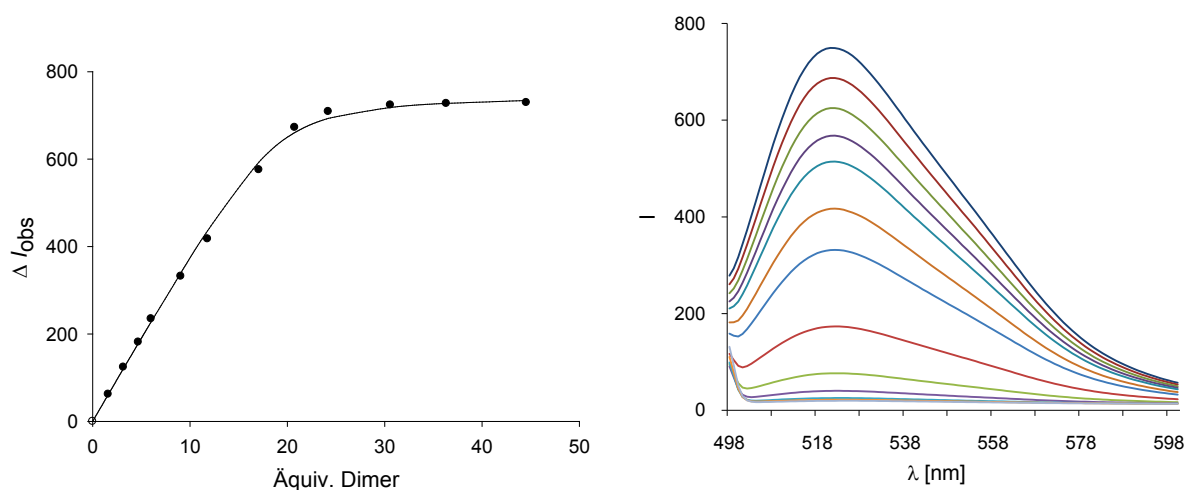
$$K_a = 4.8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (24\%)}$$

Stöchiometrie = 25:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 5 mit 12 BP (AT) DNA

Rezeptor	Dimer 5	M (5) [g/mol]	2470.30
DNA	12 BP (AT) [Fl]-DNA	m (5) [mg]	0.629
T [°C]	25	V (5) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[5] ₀ [mol/L]	$2.55 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[5] [mol/L]	[5] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	749.1	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.21 \cdot 10^{-6}$	1.61	687.1	62.0	61.5	0.384	23.787
10	720	$6.35 \cdot 10^{-6}$	3.17	625.0	124.1	121.1	0.240	29.740
10	730	$9.40 \cdot 10^{-6}$	4.70	567.9	181.2	178.8	0.175	31.785
10	740	$1.20 \cdot 10^{-5}$	6.01	514.5	234.6	227.7	0.143	33.480
20	760	$1.81 \cdot 10^{-5}$	9.07	417.0	332.1	340.0	0.099	32.990
20	780	$2.36 \cdot 10^{-5}$	11.81	331.6	417.5	436.2	0.078	32.595
40	820	$3.42 \cdot 10^{-5}$	17.08	173.6	575.5	593.1	0.055	31.830
30	850	$4.15 \cdot 10^{-5}$	20.76	76.7	672.4	660.7	0.046	30.894
30	880	$4.84 \cdot 10^{-5}$	24.21	40.3	708.8	693.1	0.040	28.115
60	940	$6.12 \cdot 10^{-5}$	30.59	25.4	723.7	718.2	0.032	22.908
60	1000	$7.27 \cdot 10^{-5}$	36.33	21.9	727.2	727.5	0.027	19.479
100	1100	$8.91 \cdot 10^{-5}$	44.55	19.7	729.4	734.2	0.022	16.012



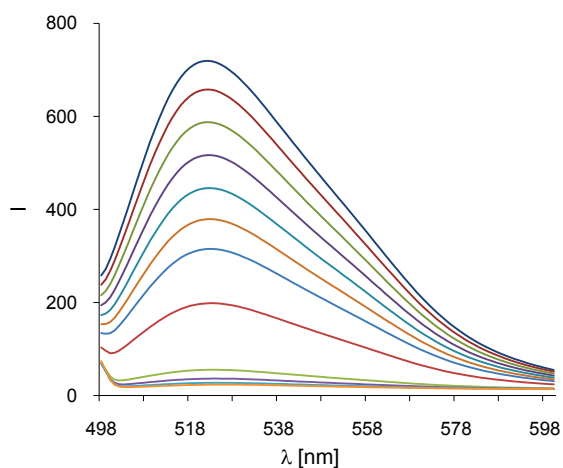
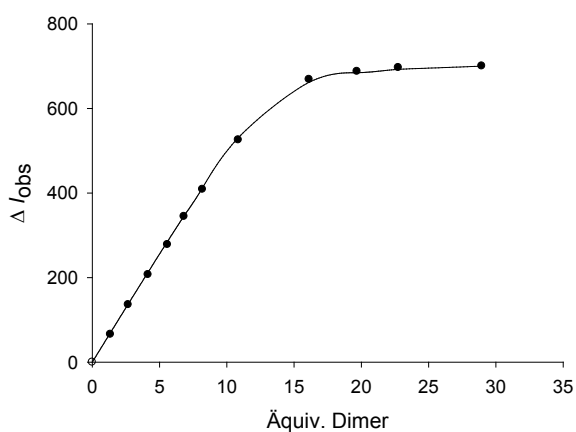
$$K_a = 9.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (26\%)}$$

Stöchiometrie = 19:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 6 mit 12 BP (AT) DNA

Rezeptor	Dimer 6	M (6) [g/mol]	2484.32
DNA	12 BP (AT) [Fl]-DNA	m (6) [mg]	0.611
T [°C]	25	V (6) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[6] ₀ [mol/L]	$2.46 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[6] [mol/L]	[6] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	723.7	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$2.70 \cdot 10^{-6}$	1.35	657.9	65.8	69.7	0.425	27.984
10	720	$5.35 \cdot 10^{-6}$	2.67	587.8	135.9	137.6	0.272	36.997
10	730	$8.30 \cdot 10^{-6}$	4.15	516.9	206.8	212.8	0.194	40.161
10	740	$1.12 \cdot 10^{-5}$	5.59	445.8	277.9	285.3	0.152	42.172
20	760	$1.36 \cdot 10^{-5}$	6.82	379.1	344.6	346.4	0.128	44.058
20	780	$1.64 \cdot 10^{-5}$	8.20	315.1	408.6	412.9	0.109	44.422
40	820	$2.17 \cdot 10^{-5}$	10.86	198.2	525.5	531.0	0.084	44.325
30	850	$3.22 \cdot 10^{-5}$	16.11	55.2	668.5	662.1	0.058	39.063
30	880	$3.94 \cdot 10^{-5}$	19.68	36.1	687.6	684.6	0.048	33.257
40	920	$4.55 \cdot 10^{-5}$	22.75	27.1	696.6	692.7	0.042	29.332
80	1000	$5.79 \cdot 10^{-5}$	28.95	23.3	700.4	700.0	0.033	23.384



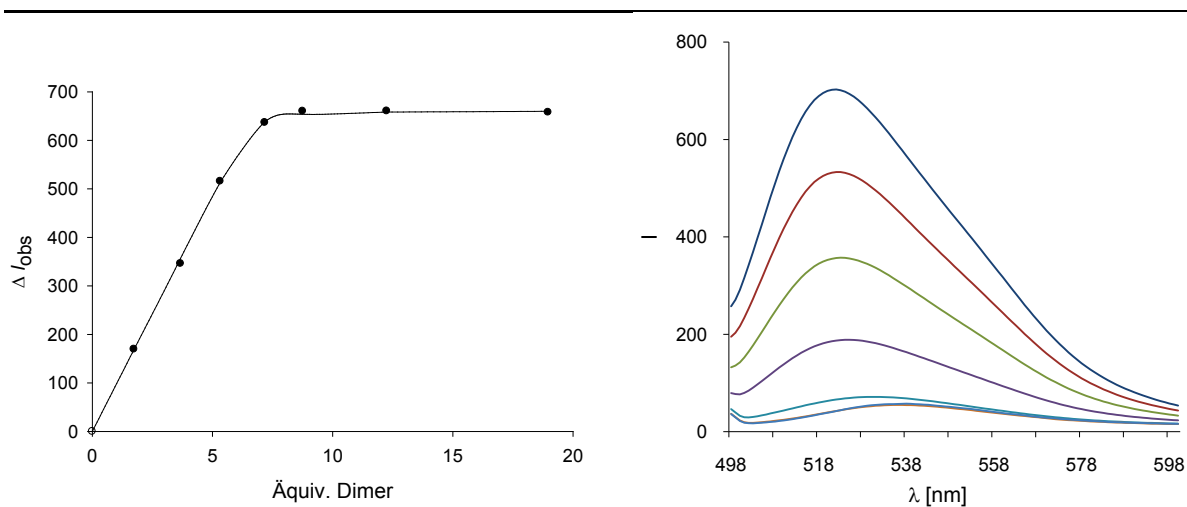
$$K_a = 1.9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (20\%)}$$

Stöchiometrie = 13:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 7 mit 12 BP (AT) DNA

Rezeptor	Dimer 7	M (7) [g/mol]	1999.09
DNA	12 BP (AT) [Fl]-DNA	m (7) [mg]	0.633
T [°C]	25	V (7) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[7] ₀ [mol/L]	$3.17 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[7] [mol/L]	[7] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	702.7	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.47 \cdot 10^{-6}$	1.73	533.3	169.4	169.1	0.366	61.952
10	720	$7.34 \cdot 10^{-6}$	3.67	356.7	346.0	356.8	0.214	74.082
10	730	$1.07 \cdot 10^{-5}$	5.33	187.2	515.5	513.7	0.158	81.491
10	740	$1.44 \cdot 10^{-5}$	7.17	66.1	636.6	638.6	0.122	77.878
10	750	$1.75 \cdot 10^{-5}$	8.76	42.6	660.1	653.8	0.102	67.659
20	770	$2.45 \cdot 10^{-5}$	12.25	42.3	660.4	658.3	0.075	49.843
40	810	$3.79 \cdot 10^{-5}$	18.96	44.9	657.8	659.8	0.050	32.950



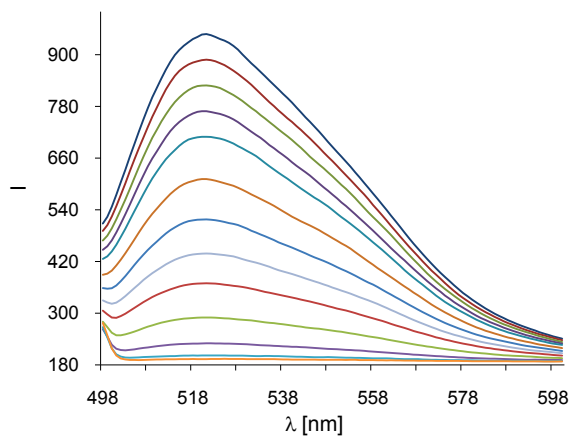
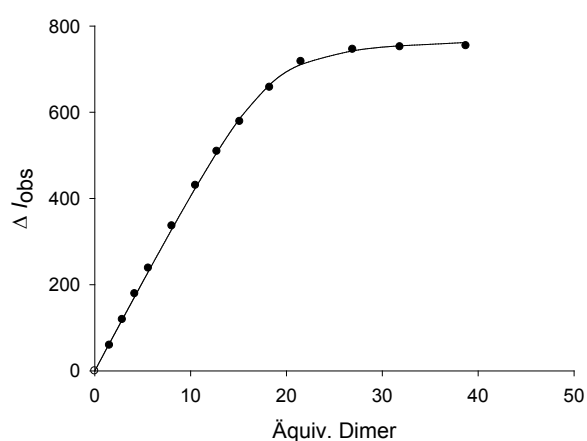
$$K_a = 2.2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ (24\%)}$$

Stöchiometrie = 9:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 55 mit 12 BP (AT) DNA

Rezeptor	Dimer 55	M (55) [g/mol]	2320.30
DNA	12 BP (AT) [Fl]-DNA	m (55) [mg]	0.511
T [°C]	25	V (55) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[55] ₀ [mol/L]	$2.20 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[55] [mol/L]	[55] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	947.9	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.08 \cdot 10^{-6}$	1.54	888.4	59.5	64.0	0.394	23.414
10	720	$5.75 \cdot 10^{-6}$	2.88	828.7	119.2	119.1	0.258	30.757
10	730	$8.36 \cdot 10^{-6}$	4.18	769.0	178.9	172.6	0.193	34.554
10	740	$1.12 \cdot 10^{-5}$	5.60	709.6	238.3	230.8	0.151	36.081
20	760	$1.61 \cdot 10^{-5}$	8.05	611.5	336.4	329.0	0.111	37.174
20	780	$2.11 \cdot 10^{-5}$	10.52	517.6	430.3	425.2	0.087	37.338
20	800	$2.55 \cdot 10^{-5}$	12.75	438.7	509.2	506.9	0.073	37.041
20	820	$3.03 \cdot 10^{-5}$	15.13	369.4	578.5	585.5	0.062	35.862
30	850	$3.65 \cdot 10^{-5}$	18.26	290.1	657.8	664.1	0.052	34.161
30	880	$4.30 \cdot 10^{-5}$	21.52	230.1	717.8	710.8	0.044	31.874
60	940	$5.38 \cdot 10^{-5}$	26.91	202.0	745.9	742.5	0.036	26.730
60	1000	$6.37 \cdot 10^{-5}$	31.85	196.1	751.8	754.1	0.030	22.886
100	1100	$7.75 \cdot 10^{-5}$	38.73	193.6	754.3	761.9	0.025	18.985



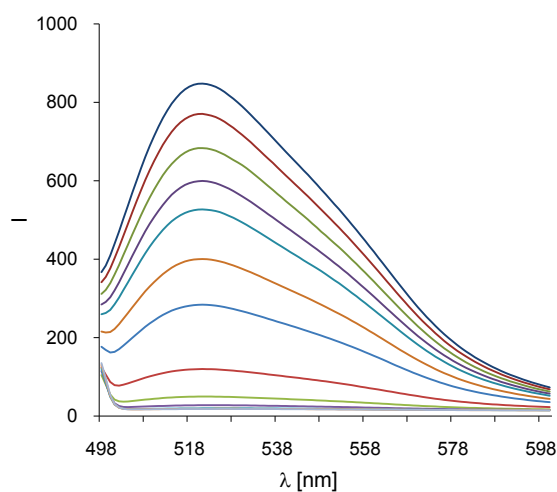
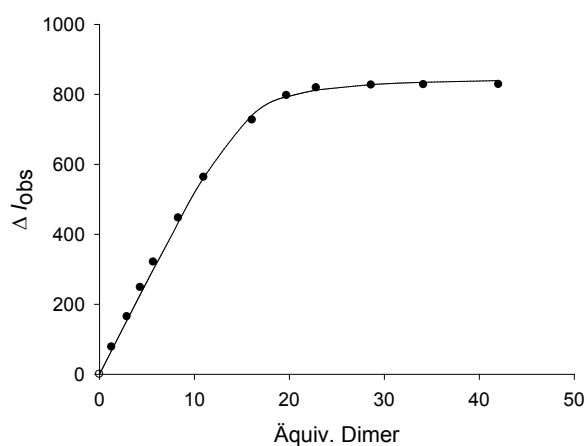
$$K_a = 1.1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (15\%)}$$

Stöchiometrie = 18:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 79 mit 12 BP (AT) DNA

Rezeptor	Dimer 79	M (79) [g/mol]	2598.56
DNA	12 BP (AT) [Fl]-DNA	m (79) [mg]	0.612
T [°C]	25	V (79) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[79] ₀ [mol/L]	$2.36 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[79] [mol/L]	[79] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	846.5	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$2.58 \cdot 10^{-6}$	1.29	768.6	77.9	69.0	0.437	34.018
10	720	$5.82 \cdot 10^{-6}$	2.91	682.2	164.3	155.0	0.256	42.046
10	730	$8.62 \cdot 10^{-6}$	4.31	598.6	247.9	228.8	0.188	46.701
10	740	$1.14 \cdot 10^{-5}$	5.68	526.0	320.5	300.2	0.150	48.015
20	760	$1.66 \cdot 10^{-5}$	8.31	399.9	446.6	434.4	0.107	47.958
20	780	$2.20 \cdot 10^{-5}$	10.98	283.7	562.8	561.9	0.083	46.972
40	820	$3.22 \cdot 10^{-5}$	16.09	119.9	726.6	740.9	0.059	42.523
30	850	$3.94 \cdot 10^{-5}$	19.70	49.8	796.7	793.0	0.048	38.481
30	880	$4.57 \cdot 10^{-5}$	22.83	27.8	818.7	812.3	0.042	34.355
60	940	$5.73 \cdot 10^{-5}$	28.63	20.0	826.5	827.8	0.034	27.895
60	1000	$6.83 \cdot 10^{-5}$	34.14	18.7	827.8	834.4	0.028	23.560
100	1100	$8.41 \cdot 10^{-5}$	42.05	18.2	828.3	839.3	0.023	19.241



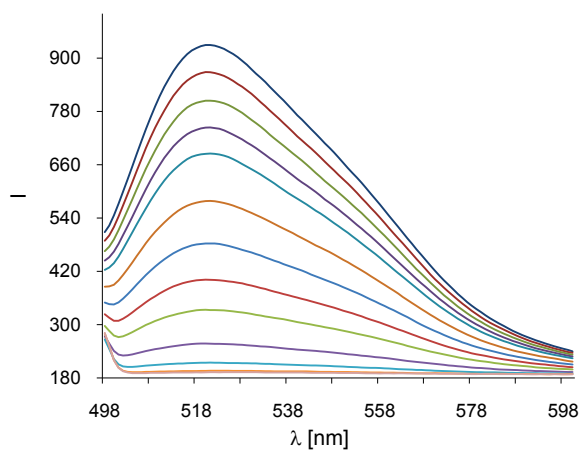
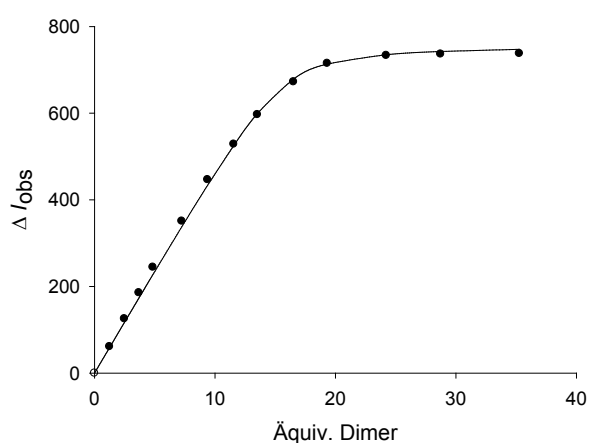
$$K_a = 1.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (26\%)}$$

Stöchiometrie = 16:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 80 mit 12 BP (AT) DNA

Rezeptor	Dimer 80	M (80) [g/mol]	2536.49
DNA	12 BP (AT) [Fl]-DNA	m (80) [mg]	0.513
T [°C]	25	V (80) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[80] ₀ [mol/L]	$2.02 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[80] [mol/L]	[80] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	929.4	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$2.52 \cdot 10^{-6}$	1.26	868.4	61.0	59.4	0.443	27.013
10	720	$4.97 \cdot 10^{-6}$	2.49	804.0	125.4	117.2	0.287	35.979
10	730	$7.37 \cdot 10^{-6}$	3.68	743.8	185.6	173.3	0.214	39.634
10	740	$9.70 \cdot 10^{-6}$	4.85	685.0	244.4	227.7	0.171	41.767
20	760	$1.45 \cdot 10^{-5}$	7.24	578.6	350.8	337.8	0.121	42.551
20	780	$1.88 \cdot 10^{-5}$	9.39	482.8	446.6	433.9	0.096	42.983
20	800	$2.31 \cdot 10^{-5}$	11.57	400.9	528.5	526.0	0.080	42.061
20	820	$2.70 \cdot 10^{-5}$	13.52	332.7	596.7	599.5	0.069	41.095
30	850	$3.30 \cdot 10^{-5}$	16.52	257.2	672.2	678.9	0.057	38.366
30	880	$3.87 \cdot 10^{-5}$	19.32	214.5	714.9	713.5	0.049	35.177
60	940	$4.84 \cdot 10^{-5}$	24.22	196.1	733.3	735.1	0.040	29.075
60	1000	$5.75 \cdot 10^{-5}$	28.73	192.9	736.5	742.5	0.034	24.773
100	1100	$7.05 \cdot 10^{-5}$	35.26	191.6	737.8	747.6	0.028	20.345



$$K_a = 1.8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (27\%)}$$

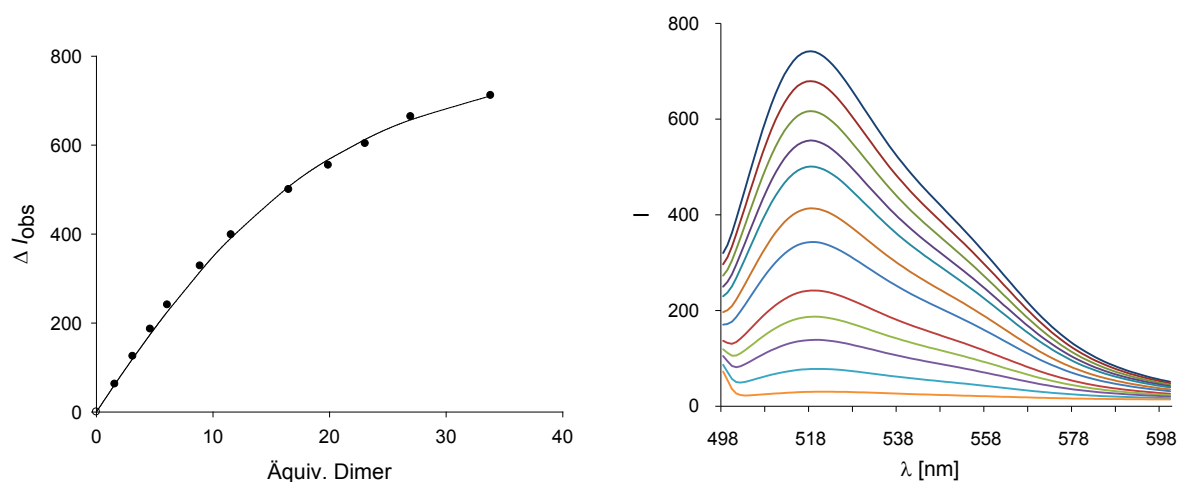
Stöchiometrie = 16:1 (Rezeptor : DNA)

5.4.1.4 Fluoreszenztitrationen mit 12 BP RNA

Fluoreszenztitration von Dimer 1 mit 12 BP RNA

Rezeptor	Dimer 1	M (1) [g/mol]	2212.22
DNA	12 BP [6-FAM]-RNA	m (1) [mg]	0.499
T [°C]	25	V (1) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[1] ₀ [mol/L]	2.26·10 ⁻⁴
		[RNA] ₀ [mol/L]	2.00·10 ⁻⁶

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[1] [mol/L]	[1] / [RNA]	I _{518 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	741.7	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	3.18·10 ⁻⁶	1.59	679.3	62.4	62.3	0.386	24.114
10	720	6.27·10 ⁻⁶	3.13	616.7	125.1	120.7	0.242	30.258
10	730	9.27·10 ⁻⁶	4.63	555.5	186.3	175.2	0.177	33.058
10	740	1.22·10 ⁻⁵	6.10	501.1	240.7	225.9	0.141	33.915
20	760	1.78·10 ⁻⁵	8.90	413.6	328.2	315.9	0.101	33.133
20	780	2.31·10 ⁻⁵	11.57	343.3	398.5	391.8	0.080	31.707
40	820	3.30·10 ⁻⁵	16.50	241.8	499.9	506.8	0.057	28.559
30	850	3.98·10 ⁻⁵	19.90	187.0	554.7	567.8	0.048	26.539
30	880	4.61·10 ⁻⁵	23.07	138.6	603.1	613.2	0.042	25.057
40	920	5.39·10 ⁻⁵	26.97	77.8	663.9	657.0	0.036	23.738
80	1000	6.77·10 ⁻⁵	33.83	30.2	711.5	711.1	0.029	20.426



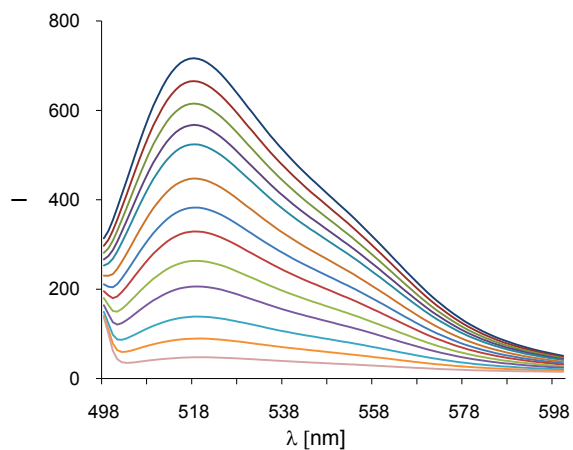
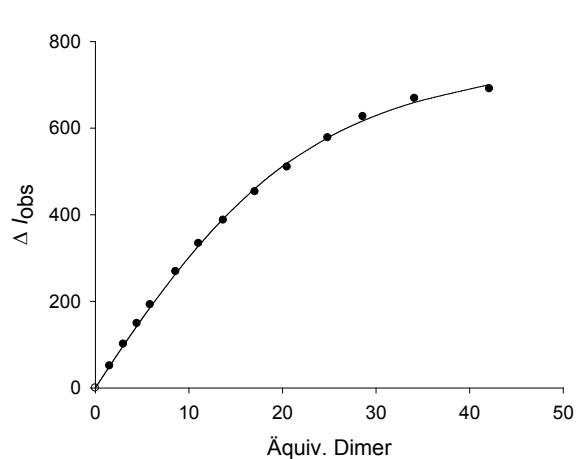
$$K_a = 9.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ (19\%)}$$

Stöchiometrie = 17:1 (Rezeptor : RNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 2 mit 12 BP RNA

Rezeptor	Dimer 2	M (2) [g/mol]	2240.27
DNA	12 BP [6-FAM]-RNA	m (2) [mg]	0.547
T [°C]	25	V (2) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[2] ₀ [mol/L]	2.44·10 ⁻⁴
		[RNA] ₀ [mol/L]	2.00·10 ⁻⁶

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[2] [mol/L]	[2] / [RNA]	I _{518 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	716.4	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	3.04·10 ⁻⁶	1.52	665.5	50.9	50.4	0.397	20.188
10	720	6.01·10 ⁻⁶	3.01	615.1	101.3	98.3	0.250	25.293
10	730	8.91·10 ⁻⁶	4.45	567.5	148.9	143.6	0.183	27.307
10	740	1.17·10 ⁻⁵	5.87	524.1	192.3	186.3	0.146	28.008
20	760	1.72·10 ⁻⁵	8.59	447.5	268.9	264.2	0.104	28.033
20	780	1.21·10 ⁻⁵	11.03	382.7	333.7	328.4	0.083	27.728
20	800	2.74·10 ⁻⁵	13.68	329.0	387.4	391.1	0.068	26.392
30	830	3.41·10 ⁻⁵	17.06	263.3	453.1	460.8	0.055	25.086
30	860	4.10·10 ⁻⁵	20.51	206.2	510.2	519.7	0.046	23.722
40	900	4.97·10 ⁻⁵	24.85	138.7	577.7	578.2	0.039	22.352
40	940	5.72·10 ⁻⁵	28.60	89.7	626.7	617.1	0.034	21.169
60	1000	6.83·10 ⁻⁵	34.13	47.7	668.7	659.6	0.028	19.036
100	1100	8.43·10 ⁻⁵	42.12	25.5	690.9	700.7	0.023	16.021



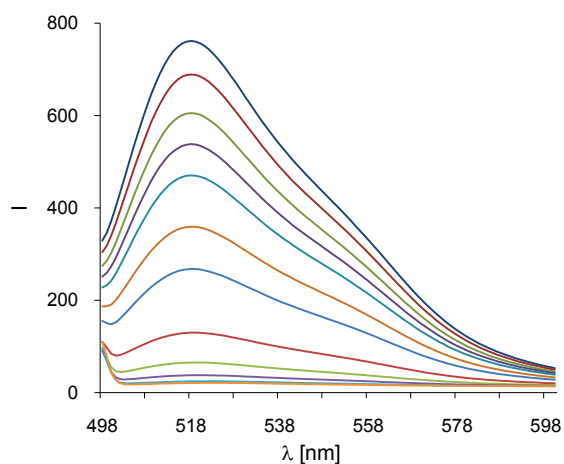
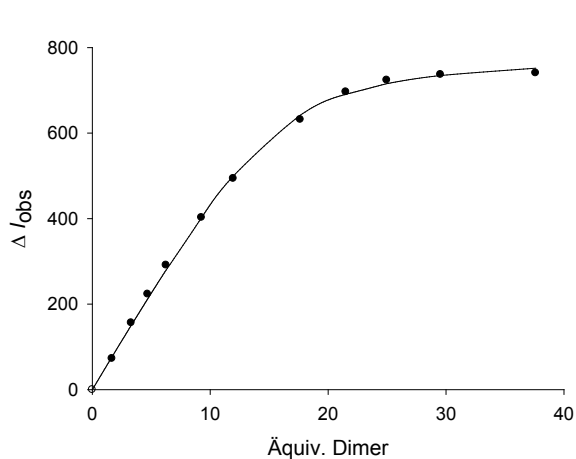
$$K_a = 1.0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (19\%)}$$

Stöchiometrie = 20:1 (Rezeptor : RNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 3 mit 12 BP RNA

Rezeptor	Dimer 3	M (3) [g/mol]	2268.32
DNA	12 BP [6-FAM]-RNA	m (3) [mg]	0.607
T [°C]	25	V (3) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[3] ₀ [mol/L]	$2.68 \cdot 10^{-4}$
		[RNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[3] [mol/L]	[3] / [RNA]	I _{518 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	761.4	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.35 \cdot 10^{-6}$	1.67	688.8	72.6	76.7	0.374	27.166
10	720	$6.61 \cdot 10^{-6}$	3.30	605.2	156.2	150.4	0.232	36.294
10	730	$9.40 \cdot 10^{-6}$	4.70	538.0	223.4	212.2	0.175	39.205
10	740	$1.25 \cdot 10^{-5}$	6.26	470.2	291.2	279.6	0.138	40.132
20	760	$1.85 \cdot 10^{-5}$	9.26	359.1	402.3	402.1	0.097	39.205
20	780	$2.39 \cdot 10^{-5}$	11.95	267.7	493.7	499.3	0.077	38.114
40	820	$3.53 \cdot 10^{-5}$	17.64	129.7	631.7	641.9	0.054	33.882
30	850	$4.30 \cdot 10^{-5}$	21.50	65.0	696.4	690.7	0.044	30.951
30	880	$4.99 \cdot 10^{-5}$	24.97	37.6	723.8	715.6	0.039	27.872
40	920	$5.91 \cdot 10^{-5}$	29.53	24.4	737.0	734.6	0.033	24.139
80	1000	$7.52 \cdot 10^{-5}$	37.60	20.8	740.6	751.8	0.026	19.188



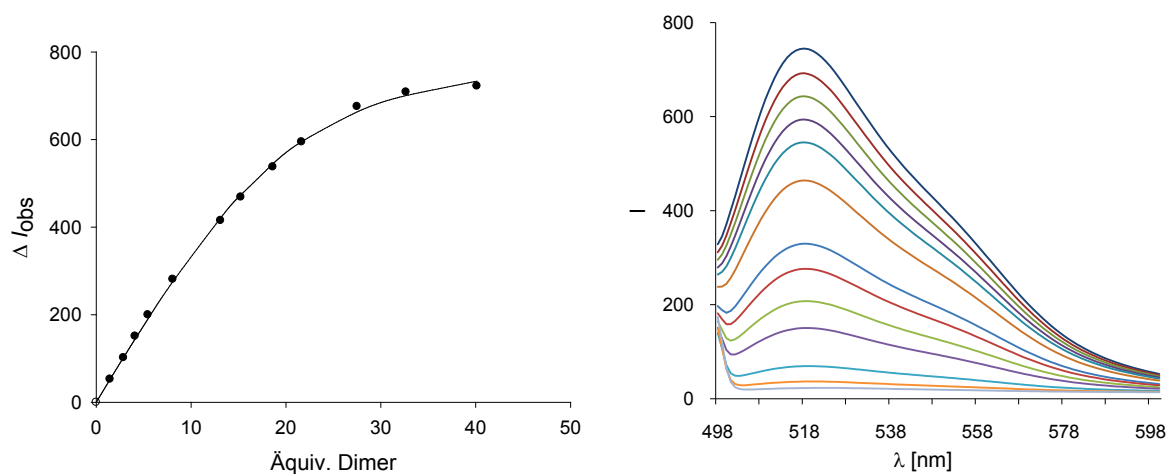
$$K_a = 4.8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (17\%)}$$

Stöchiometrie = 16:1 (Rezeptor : RNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 4 mit 12 BP RNA

Rezeptor	Dimer 4	M (4) [g/mol]	2296.38
DNA	12 BP [6-FAM]-RNA	m (4) [mg]	0.533
T [°C]	25	V (4) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[4] ₀ [mol/L]	$2.32 \cdot 10^{-4}$
		[RNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[4] [mol/L]	[4] / [RNA]	I _{518 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	745.0	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$2.92 \cdot 10^{-6}$	1.46	692.2	52.8	52.4	0.407	21.465
10	720	$5.77 \cdot 10^{-6}$	2.88	643.2	101.8	102.6	0.258	26.215
10	730	$8.20 \cdot 10^{-6}$	4.10	594.0	151.0	144.7	0.196	29.607
10	740	$1.09 \cdot 10^{-5}$	5.46	545.3	199.7	190.7	0.155	30.917
20	760	$1.62 \cdot 10^{-5}$	8.08	464.3	280.7	275.7	0.110	30.912
40	800	$2.62 \cdot 10^{-5}$	13.11	329.8	415.2	421.1	0.071	29.419
20	820	$3.05 \cdot 10^{-5}$	15.25	276.3	468.7	473.9	0.062	28.845
30	850	$3.72 \cdot 10^{-5}$	18.62	207.6	537.4	544.7	0.051	27.393
30	880	$4.33 \cdot 10^{-5}$	21.65	150.4	594.6	595.3	0.044	26.255
60	940	$5.50 \cdot 10^{-5}$	27.50	69.5	675.5	663.2	0.035	23.704
60	1000	$6.53 \cdot 10^{-5}$	32.66	36.6	708.4	700.5	0.030	21.043
100	1100	$8.03 \cdot 10^{-5}$	40.13	22.8	722.2	733.5	0.024	17.557



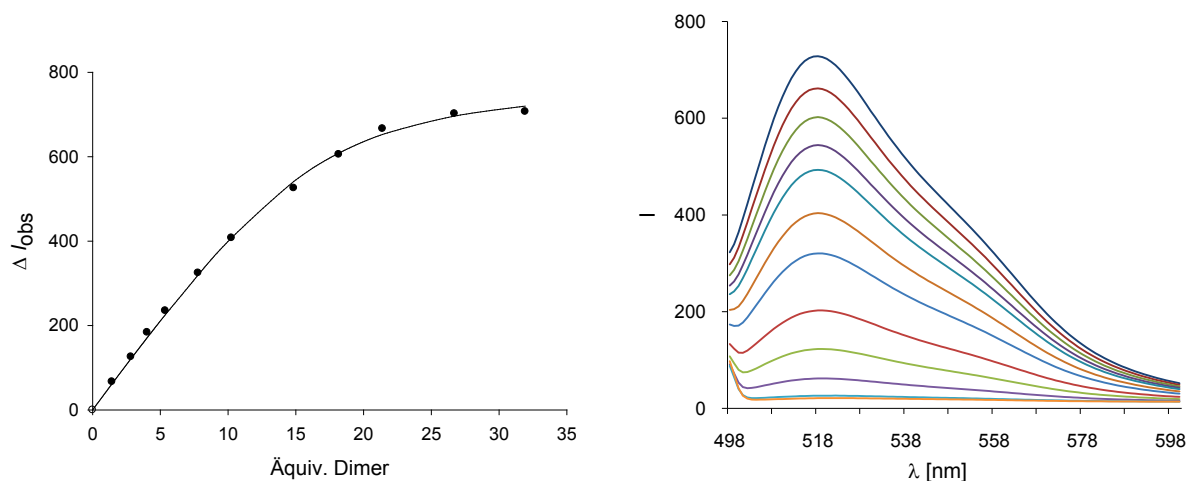
$$K_a = 1.8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (14\%)}$$

Stöchiometrie = 20:1 (Rezeptor : RNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 5 mit 12 BP RNA

Rezeptor	Dimer 5	M (5) [g/mol]	2470.30
DNA	12 BP [6-FAM]-RNA	m (5) [mg]	0.565
T [°C]	25	V (5) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[5] ₀ [mol/L]	$2.29 \cdot 10^{-4}$
		[RNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[5] [mol/L]	[5] / [RNA]	I _{518 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	728.2	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$2.87 \cdot 10^{-6}$	1.43	661.5	66.7	62.0	0.411	27.404
10	720	$5.67 \cdot 10^{-6}$	2.83	602.3	125.9	121.4	0.261	32.851
10	730	$8.06 \cdot 10^{-6}$	4.03	544.5	183.7	171.2	0.199	36.536
10	740	$1.07 \cdot 10^{-5}$	5.36	493.1	235.1	225.5	0.157	36.946
20	760	$1.56 \cdot 10^{-5}$	7.78	403.7	324.5	319.5	0.114	36.951
20	780	$2.05 \cdot 10^{-5}$	10.25	320.5	407.7	407.5	0.089	36.253
40	820	$2.97 \cdot 10^{-5}$	14.85	202.5	525.7	541.3	0.063	33.172
30	850	$3.63 \cdot 10^{-5}$	18.17	122.8	605.4	608.5	0.052	31.582
30	880	$4.28 \cdot 10^{-5}$	21.40	61.8	666.4	652.8	0.045	29.755
60	940	$5.34 \cdot 10^{-5}$	26.71	26.2	702.0	696.3	0.036	25.332
60	1000	$6.39 \cdot 10^{-5}$	31.93	21.2	707.0	719.9	0.030	21.472



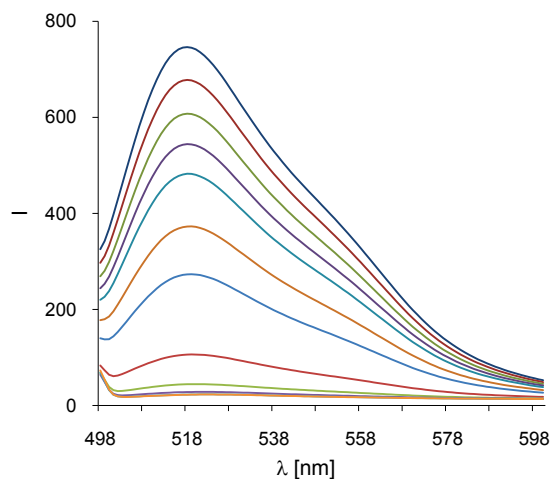
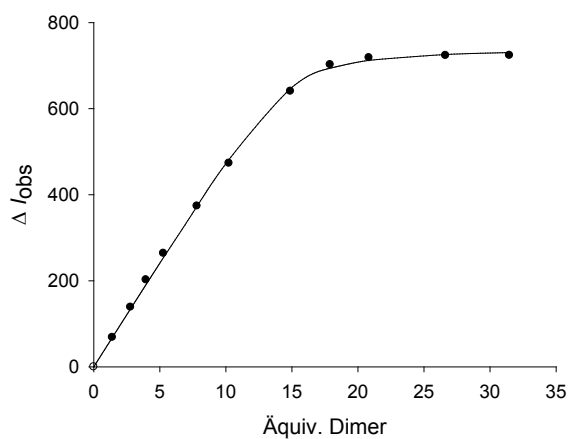
$$K_a = 3.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (23\%)}$$

Stöchiometrie = 17:1 (Rezeptor : RNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 6 mit 12 BP RNA

Rezeptor	Dimer 6	M (6) [g/mol]	2484.32
DNA	12 BP [6-FAM]-RNA	m (6) [mg]	0.562
T [°C]	25	V (6) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[6] ₀ [mol/L]	$2.26 \cdot 10^{-4}$
		[RNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[6] [mol/L]	[6] / [RNA]	I _{518 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	746.3	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$2.82 \cdot 10^{-6}$	1.41	677.9	68.4	68.5	0.415	28.362
10	720	$5.58 \cdot 10^{-6}$	2.79	607.7	138.6	135.0	0.264	36.584
10	730	$7.93 \cdot 10^{-6}$	3.97	544.2	202.1	191.6	0.201	40.699
10	740	$1.06 \cdot 10^{-5}$	5.28	482.5	263.8	254.3	0.159	42.002
20	760	$1.56 \cdot 10^{-5}$	7.82	372.7	373.6	373.3	0.113	42.369
20	780	$2.05 \cdot 10^{-5}$	10.24	273.1	473.2	481.9	0.089	42.106
40	820	$2.98 \cdot 10^{-5}$	14.90	105.9	640.4	646.8	0.063	40.289
30	850	$3.58 \cdot 10^{-5}$	17.90	44.2	702.1	694.0	0.053	37.150
30	880	$4.17 \cdot 10^{-5}$	20.84	28.0	718.3	712.4	0.046	32.884
60	940	$5.33 \cdot 10^{-5}$	26.64	22.8	723.5	725.8	0.036	26.178
60	1000	$6.29 \cdot 10^{-5}$	31.47	22.5	723.8	730.4	0.031	22.292



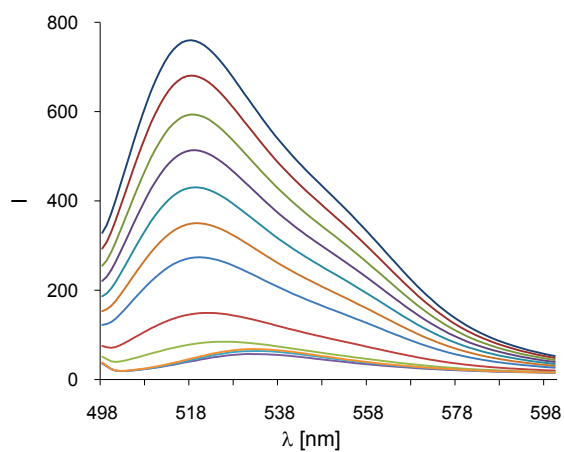
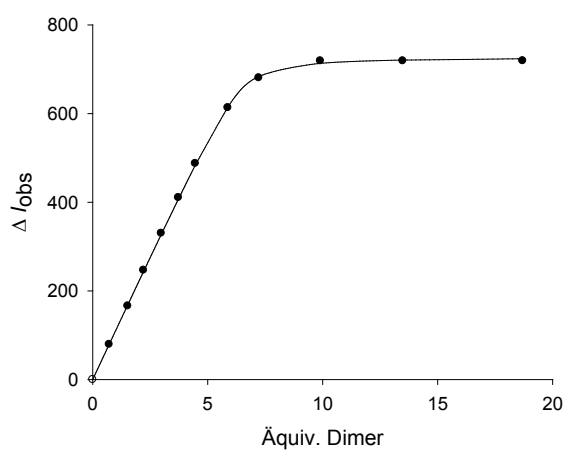
$$K_a = 1.9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (23\%)}$$

Stöchiometrie = 15:1 (Rezeptor : RNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 7 mit 12 BP RNA

Rezeptor	Dimer 7	M (7) [g/mol]	1999.09
DNA	12 BP [6-FAM]-RNA	m (7) [mg]	0.263
T [°C]	25	V (7) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[7] ₀ [mol/L]	$1.32 \cdot 10^{-4}$
		[RNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[7] [mol/L]	[7] / [RNA]	I _{518 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	759.7	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$1.44 \cdot 10^{-6}$	0.72	680.6	79.1	79.7	0.581	45.972
10	720	$3.05 \cdot 10^{-6}$	1.53	593.7	166.0	168.4	0.396	65.742
10	730	$4.43 \cdot 10^{-6}$	2.21	513.2	246.5	243.8	0.311	76.725
10	740	$5.96 \cdot 10^{-6}$	2.98	429.8	329.9	327.3	0.251	82.869
10	750	$7.46 \cdot 10^{-6}$	3.73	349.2	410.5	407.6	0.211	86.772
10	760	$8.93 \cdot 10^{-6}$	4.46	272.4	487.3	483.9	0.183	89.201
20	780	$1.18 \cdot 10^{-5}$	5.88	146.5	613.2	614.5	0.145	89.172
20	800	$1.45 \cdot 10^{-5}$	7.23	79.0	680.7	684.0	0.122	82.745
40	840	$1.98 \cdot 10^{-5}$	9.90	40.9	718.8	713.5	0.092	65.931
60	900	$2.70 \cdot 10^{-5}$	13.49	40.8	718.9	720.7	0.069	49.624
100	1000	$3.74 \cdot 10^{-5}$	18.70	40.5	719.2	723.8	0.051	36.510



$$K_a = 6.9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (12\%)}$$

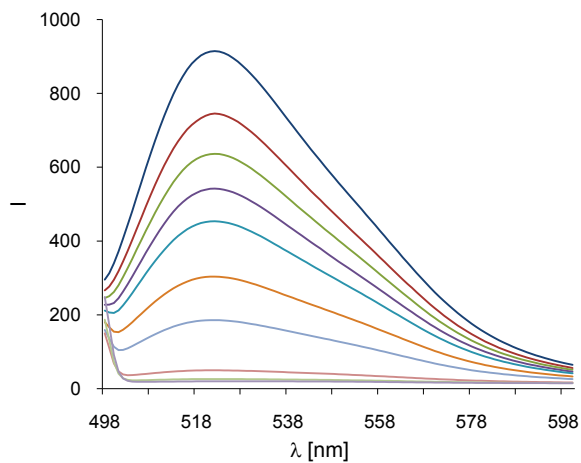
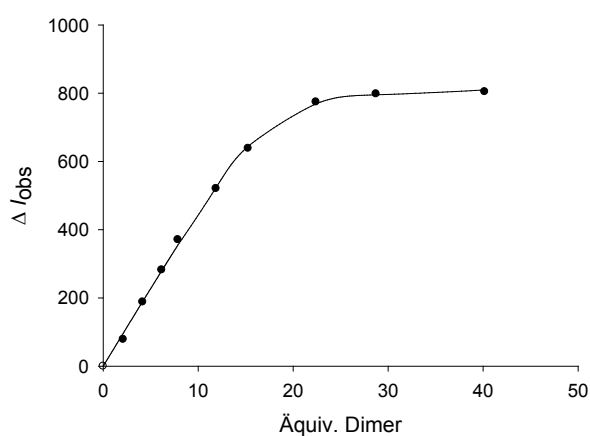
Stöchiometrie = 7:1 (Rezeptor : RNA)

5.4.1.5 Fluoreszenztitrationen mit 20 BP (AT) DNA

Fluoreszenztitration von Dimer 1 mit 20 BP (AT) DNA

Rezeptor	Dimer 1	M (1) [g/mol]	2212.22
DNA	20 BP (AT) [Fl]-DNA	m (1) [mg]	0.745
T [°C]	25	V (1) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[1] ₀ [mol/L]	$3.37 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[1] [mol/L]	[1] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	824.3	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$4.21 \cdot 10^{-6}$	2.10	745.6	78.7	96.5	0.322	25.348
10	720	$8.32 \cdot 10^{-6}$	4.16	636.1	188.2	189.8	0.194	36.490
10	730	$1.23 \cdot 10^{-5}$	6.16	542.1	282.2	279.7	0.140	39.411
10	740	$1.58 \cdot 10^{-5}$	7.87	453.6	370.7	355.4	0.113	41.778
20	760	$2.38 \cdot 10^{-5}$	11.89	303.7	520.6	524.0	0.078	40.401
20	780	$3.05 \cdot 10^{-5}$	15.26	185.9	638.4	644.8	0.061	39.254
40	820	$4.48 \cdot 10^{-5}$	22.40	50.0	774.3	769.1	0.043	33.083
40	860	$5.75 \cdot 10^{-5}$	28.73	26.3	798.0	795.4	0.034	26.845
80	940	$8.03 \cdot 10^{-5}$	40.17	20.1	804.2	809.6	0.024	19.534



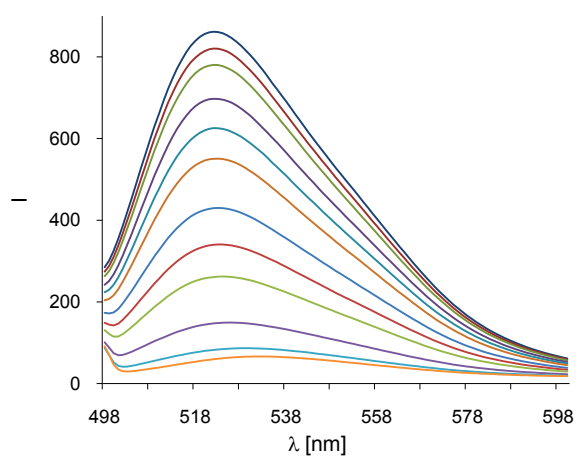
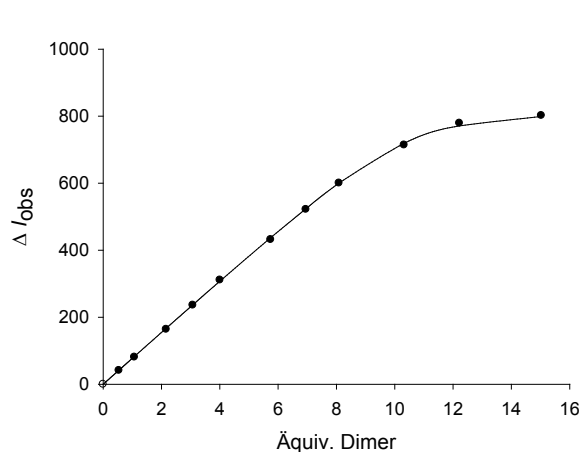
$$K_a = 1.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (28\%)}$$

Stöchiometrie = 18:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 7 mit 20 BP (AT) DNA

Rezeptor	Dimer 7	M (7) [g/mol]	1999.09
DNA	20 BP (AT) [Fl]-DNA	m (7) [mg]	0.175
T [°C]	25	V (7) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[7] ₀ [mol/L]	$8.75 \cdot 10^{-5}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[7] [mol/L]	[7] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	861.3	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$1.09 \cdot 10^{-6}$	0.54	820.2	41.1	42.2	0.647	26.609
10	720	$2.15 \cdot 10^{-6}$	1.08	780.3	81.0	83.4	0.482	39.022
20	740	$4.33 \cdot 10^{-6}$	2.16	697.5	163.8	167.2	0.316	51.798
20	760	$6.15 \cdot 10^{-6}$	3.08	625.4	235.9	237.2	0.245	57.874
20	780	$8.02 \cdot 10^{-6}$	4.01	550.4	310.9	308.0	0.200	62.086
40	820	$1.15 \cdot 10^{-5}$	5.75	429.5	431.8	437.7	0.148	63.988
30	850	$1.39 \cdot 10^{-5}$	6.96	339.8	521.5	524.3	0.126	65.541
30	880	$1.62 \cdot 10^{-5}$	8.09	260.9	600.4	600.5	0.110	66.044
60	940	$2.07 \cdot 10^{-5}$	10.32	147.3	714.0	719.1	0.088	63.054
60	1000	$2.44 \cdot 10^{-5}$	12.22	82.4	778.9	771.0	0.076	58.910
100	1100	$3.01 \cdot 10^{-5}$	15.03	59.6	801.7	799.3	0.062	50.020



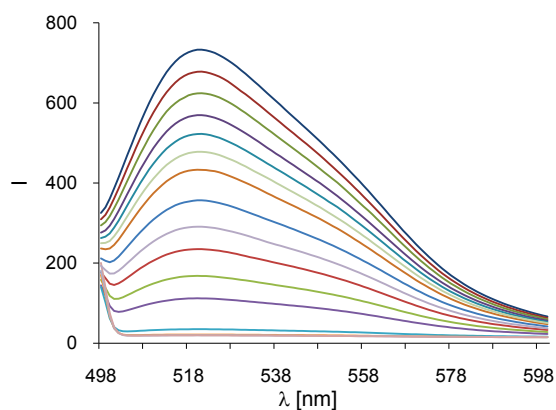
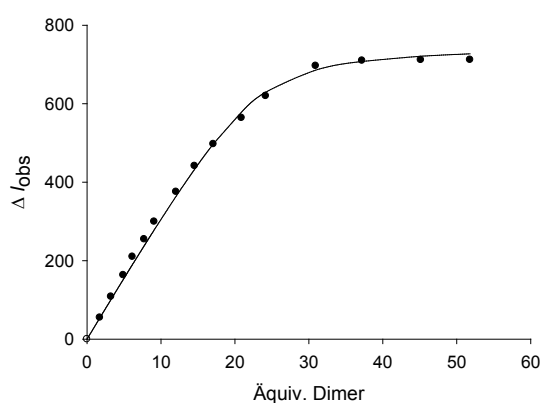
$$K_a = 2.6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (19\%)}$$

Stöchiometrie = 11:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 55 mit 20 BP (AT) DNA

Rezeptor	Dimer 55	M (55) [g/mol]	2320.30
DNA	20 BP (AT) [Fl]-DNA	m (55) [mg]	0.574
T [°C]	25	V (55) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[55] ₀ [mol/L]	$2.47 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[55] [mol/L]	[55] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	731.5	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.48 \cdot 10^{-6}$	1.74	676.7	54.8	54.4	0.365	19.984
10	720	$6.50 \cdot 10^{-6}$	3.25	623.1	108.4	101.2	0.235	25.506
10	730	$9.81 \cdot 10^{-6}$	4.90	568.2	163.3	152.1	0.169	27.667
10	740	$1.23 \cdot 10^{-5}$	6.16	521.5	210.0	190.4	0.140	29.344
10	750	$1.55 \cdot 10^{-5}$	7.73	477.0	254.5	238.0	0.115	29.150
10	760	$1.82 \cdot 10^{-5}$	9.09	432.2	299.3	278.6	0.099	29.649
20	780	$2.41 \cdot 10^{-5}$	12.05	356.0	375.5	364.3	0.077	28.774
20	800	$2.91 \cdot 10^{-5}$	14.55	290.2	441.3	433.0	0.064	28.376
20	820	$3.42 \cdot 10^{-5}$	17.09	234.3	497.2	497.4	0.055	27.485
30	850	$4.18 \cdot 10^{-5}$	20.89	167.6	563.9	578.6	0.046	25.764
30	880	$4.83 \cdot 10^{-5}$	24.17	111.8	619.7	629.5	0.040	24.621
60	940	$6.19 \cdot 10^{-5}$	30.92	34.9	696.6	685.5	0.031	21.821
60	1000	$7.44 \cdot 10^{-5}$	37.20	21.7	709.8	707.6	0.026	18.580
100	1100	$9.03 \cdot 10^{-5}$	45.14	20.1	711.4	720.9	0.022	15.419
100	1200	$1.04 \cdot 10^{-4}$	51.80	19.6	711.9	727.2	0.019	13.482



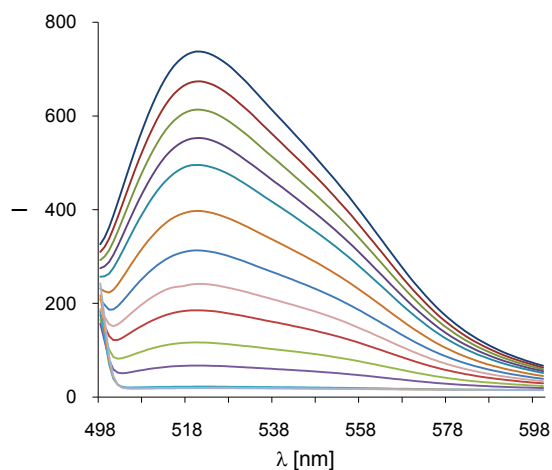
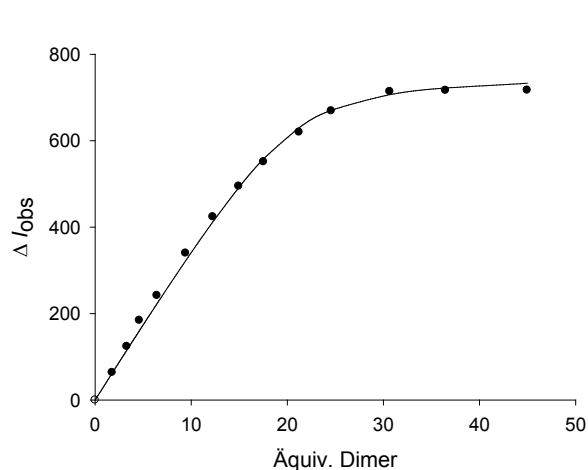
$$K_a = 5.4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (27\%)}$$

Stöchiometrie = 23:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 79 mit 20 BP (AT) DNA

Rezeptor	Dimer 79	M (79) [g/mol]	2598.56
DNA	20 BP (AT) [Fl]-DNA	m (79) [mg]	0.657
T [°C]	25	V (79) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[79] ₀ [mol/L]	$2.53 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[79] [mol/L]	[79] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	736.2	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.54 \cdot 10^{-6}$	1.77	672.6	63.6	62.0	0.361	22.965
10	720	$6.60 \cdot 10^{-6}$	3.30	612.3	123.9	115.3	0.232	28.806
10	730	$9.22 \cdot 10^{-6}$	4.61	551.9	184.3	160.5	0.178	32.847
10	740	$1.29 \cdot 10^{-5}$	6.43	494.2	242.0	222.7	0.135	32.552
20	760	$1.88 \cdot 10^{-5}$	9.41	396.2	340.0	322.0	0.096	32.655
20	780	$2.45 \cdot 10^{-5}$	12.25	312.2	424.0	412.2	0.075	32.011
20	800	$2.99 \cdot 10^{-5}$	14.94	241.4	494.8	491.6	0.063	31.032
20	820	$3.50 \cdot 10^{-5}$	17.52	184.9	551.3	557.9	0.054	29.768
30	850	$4.25 \cdot 10^{-5}$	21.24	116.3	619.9	630.1	0.045	27.879
30	880	$4.92 \cdot 10^{-5}$	24.58	67.1	669.1	670.5	0.039	26.161
60	940	$6.13 \cdot 10^{-5}$	30.66	22.4	713.8	706.6	0.032	22.546
60	1000	$7.29 \cdot 10^{-5}$	36.46	19.6	716.6	722.0	0.027	19.128
100	1100	$8.99 \cdot 10^{-5}$	44.97	19.1	717.1	733.0	0.022	15.601



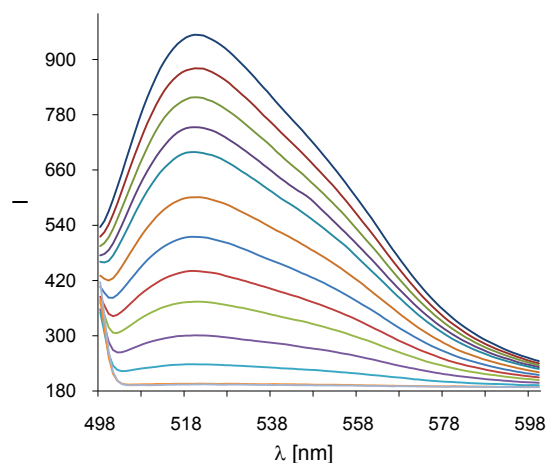
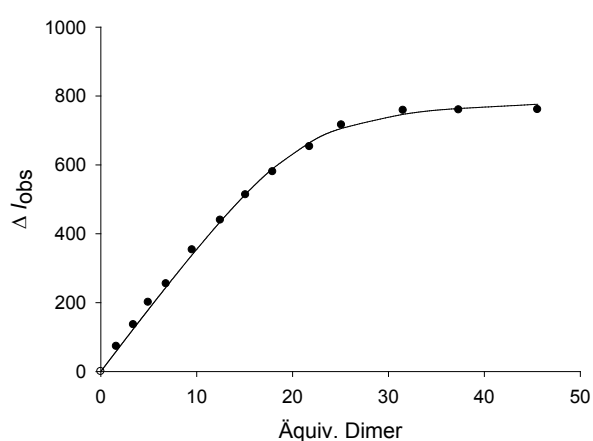
$$K_a = 6.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (21\%)}$$

Stöchiometrie = 21:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 80 mit 20 BP (AT) DNA

Rezeptor	Dimer 80	M (80) [g/mol]	2536.49
DNA	20 BP (AT) [Fl]-DNA	m (80) [mg]	0.662
T [°C]	25	V (80) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[80] ₀ [mol/L]	$2.61 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[80] [mol/L]	[80] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	953.8	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.25 \cdot 10^{-6}$	1.63	880.8	73.0	59.5	0.381	27.798
10	720	$6.82 \cdot 10^{-6}$	3.41	817.9	135.9	124.1	0.227	30.832
10	730	$9.90 \cdot 10^{-6}$	4.95	752.9	200.9	179.5	0.168	33.762
10	740	$1.37 \cdot 10^{-5}$	6.83	699.0	254.8	245.9	0.128	32.554
20	760	$1.91 \cdot 10^{-5}$	9.54	600.5	353.3	339.5	0.095	33.523
20	780	$2.49 \cdot 10^{-5}$	12.47	514.6	439.2	435.7	0.074	32.600
20	800	$3.02 \cdot 10^{-5}$	15.11	440.7	513.1	515.2	0.062	31.857
20	820	$3.59 \cdot 10^{-5}$	17.93	373.9	579.9	589.3	0.053	30.631
30	850	$4.36 \cdot 10^{-5}$	21.78	300.9	652.9	664.7	0.044	28.664
30	880	$5.02 \cdot 10^{-5}$	25.10	238.0	715.8	706.1	0.038	27.424
60	940	$6.31 \cdot 10^{-5}$	31.53	195.6	758.2	746.9	0.031	23.307
60	1000	$7.47 \cdot 10^{-5}$	37.33	194.2	759.6	763.8	0.026	19.819
100	1100	$9.11 \cdot 10^{-5}$	45.55	193.3	760.5	776.1	0.021	16.336



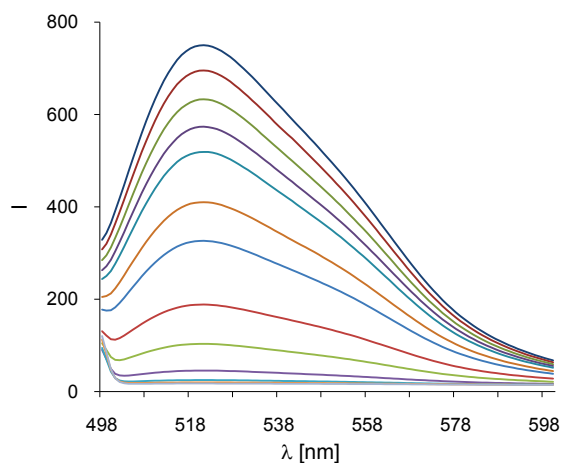
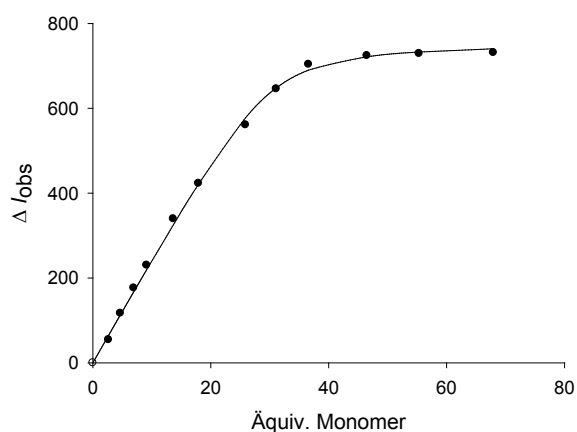
$$K_a = 5.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (25\%)}$$

Stöchiometrie = 21:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Monomer M1 mit 20 BP (AT) DNA

Rezeptor	Monomer M1	M (M1) [g/mol]	854.824
DNA	20 BP (AT) [Fl]-DNA	m (M1) [mg]	0.326
T [°C]	25	V (M1) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[M1] ₀ [mol/L]	$3.81 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[M1] [mol/L]	[M1] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	749.0	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$5.32 \cdot 10^{-6}$	2.66	694.4	54.6	64.6	0.273	14.915
10	720	$9.36 \cdot 10^{-6}$	4.68	632.2	116.8	113.3	0.176	20.566
10	730	$1.39 \cdot 10^{-5}$	6.93	572.6	176.4	167.4	0.126	22.234
10	740	$1.83 \cdot 10^{-5}$	9.13	518.7	230.3	219.7	0.099	22.724
20	760	$2.73 \cdot 10^{-5}$	13.64	409.5	339.5	325.0	0.068	23.190
20	780	$3.59 \cdot 10^{-5}$	17.93	325.8	423.2	421.3	0.053	22.359
40	820	$6.22 \cdot 10^{-5}$	25.91	188.1	560.9	577.8	0.037	20.845
30	850	$7.32 \cdot 10^{-5}$	31.11	103.2	645.8	648.2	0.031	20.111
30	880	$9.32 \cdot 10^{-5}$	36.59	45.4	703.6	690.1	0.027	18.720
60	940	$9.30 \cdot 10^{-5}$	46.48	24.8	724.2	721.5	0.021	15.253
60	1000	$1.11 \cdot 10^{-4}$	55.33	19.7	729.3	732.7	0.018	12.946
100	1100	$1.36 \cdot 10^{-4}$	67.94	17.5	731.5	740.5	0.015	10.611



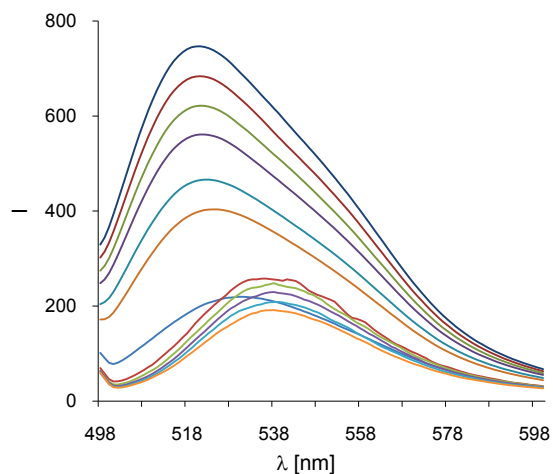
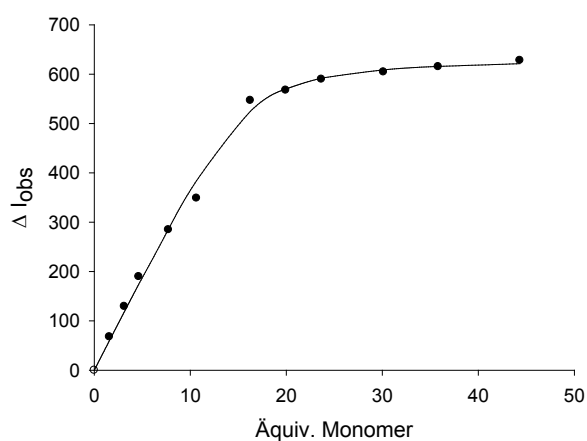
$$K_a = 5.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (25\%)}$$

Stöchiometrie = 30:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Monomer M7 mit 20 BP (AT) DNA

Rezeptor	Monomer M7	M (M7) [g/mol]	1022.94
DNA	20 BP (AT) [Fl]-DNA	m (M7) [mg]	0.259
T [°C]	25	V (M7) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[M7] ₀ [mol/L]	$2.53 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[M7] [mol/L]	[M7] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	750.7	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.17 \cdot 10^{-6}$	1.58	683.0	67.7	60.3	0.387	26.190
10	720	$6.26 \cdot 10^{-6}$	3.13	621.4	129.3	118.5	0.242	31.303
10	730	$9.28 \cdot 10^{-6}$	4.64	561.2	189.5	174.5	0.177	33.607
20	750	$1.55 \cdot 10^{-5}$	7.72	466.1	284.6	285.9	0.115	32.623
20	770	$2.31 \cdot 10^{-5}$	10.66	402.1	348.6	384.2	0.086	29.905
40	810	$3.25 \cdot 10^{-5}$	16.26	203.9	546.8	524.9	0.058	31.677
30	840	$3.99 \cdot 10^{-5}$	19.94	183.1	567.6	570.0	0.048	27.100
30	870	$4.73 \cdot 10^{-5}$	23.66	161.1	589.6	591.9	0.041	23.914
60	930	$6.02 \cdot 10^{-5}$	30.12	146.3	604.4	608.8	0.032	19.422
60	990	$7.16 \cdot 10^{-5}$	35.82	135.5	615.2	615.8	0.027	16.708
100	1090	$8.87 \cdot 10^{-5}$	44.33	123.0	627.7	621.3	0.022	13.848



$$K_a = 7.8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (37\%)}$$

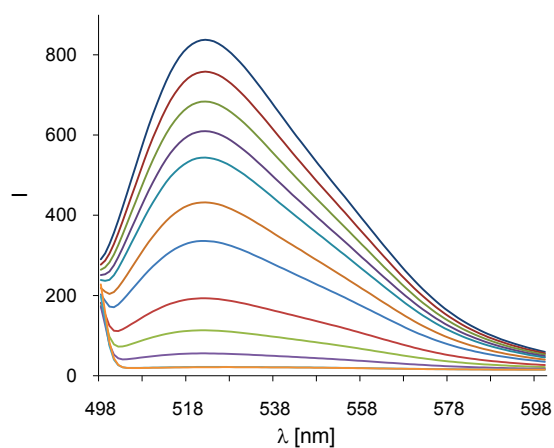
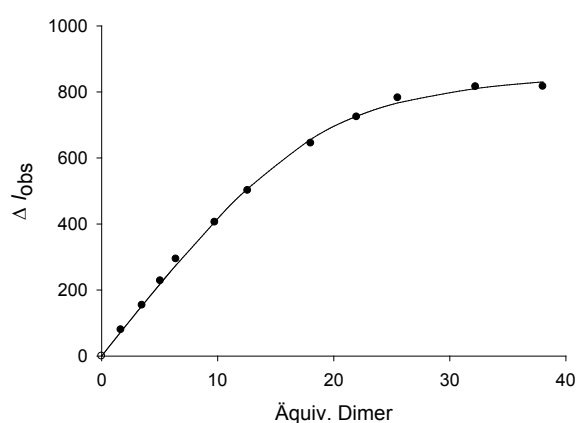
Stöchiometrie = 16:1 (Rezeptor : DNA)

5.4.1.6 Fluoreszenztitrationen mit 20 BP (GC) DNA

Fluoreszenztitration von Dimer 1 mit 20 BP (GC) DNA

Rezeptor	Dimer 1	M (1) [g/mol]	2212.22
DNA	20 BP (GC) [Fl]-DNA	m (1) [mg]	0.588
T [°C]	25	V (1) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[1] ₀ [mol/L]	$2.66 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[1] [mol/L]	[1] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	837.6	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.33 \cdot 10^{-6}$	1.66	758.0	79.6	73.5	0.375	29.882
10	720	$6.97 \cdot 10^{-6}$	3.49	683.7	153.9	152.6	0.223	34.303
10	730	$1.01 \cdot 10^{-5}$	5.06	609.7	227.9	219.6	0.165	37.578
10	740	$1.28 \cdot 10^{-5}$	6.41	543.8	293.8	275.5	0.135	39.626
20	760	$1.95 \cdot 10^{-5}$	9.76	432.1	405.5	406.8	0.093	37.694
20	780	$2.52 \cdot 10^{-5}$	12.58	335.9	501.7	506.7	0.074	36.932
40	820	$3.61 \cdot 10^{-5}$	18.02	193.0	644.6	656.5	0.053	33.885
30	850	$4.40 \cdot 10^{-5}$	21.97	113.3	724.3	726.2	0.044	31.527
30	880	$5.11 \cdot 10^{-5}$	25.52	55.6	782.0	766.7	0.038	29.482
60	940	$6.45 \cdot 10^{-5}$	32.23	21.8	815.8	810.2	0.030	24.552
60	1000	$7.61 \cdot 10^{-5}$	38.04	21.1	816.5	830.4	0.026	20.917



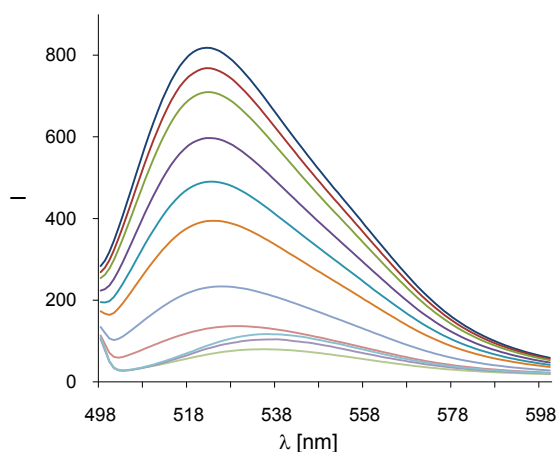
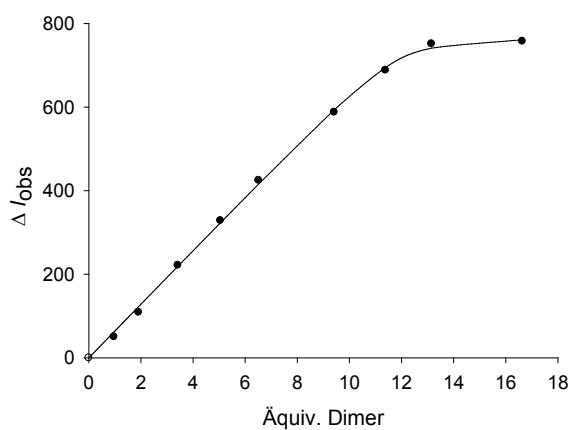
$$K_a = 3.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (20\%)}$$

Stöchiometrie = 19:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 7 mit 20 BP (GC) DNA

Rezeptor	Dimer 7	M (7) [g/mol]	1999.09
DNA	20 BP (GC) [Fl]-DNA	m (7) [mg]	0.276
T [°C]	25	V (7) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[7] ₀ [mol/L]	$1.38 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[7] [mol/L]	[7] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	818.1	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$1.94 \cdot 10^{-6}$	0.97	768.1	50.0	62.1	0.508	25.410
10	720	$3.82 \cdot 10^{-6}$	1.91	709.3	108.8	122.5	0.344	37.405
20	740	$6.84 \cdot 10^{-6}$	3.42	596.8	221.3	219.2	0.226	50.062
20	760	$1.01 \cdot 10^{-5}$	5.05	489.8	328.3	323.3	0.165	54.233
20	780	$1.30 \cdot 10^{-5}$	6.52	393.4	424.7	415.9	0.133	56.491
40	820	$1.88 \cdot 10^{-5}$	9.42	230.5	587.6	593.4	0.096	56.404
30	850	$2.28 \cdot 10^{-5}$	11.38	130.1	688.0	694.6	0.081	55.556
30	880	$2.63 \cdot 10^{-5}$	13.15	66.7	751.4	741.1	0.071	53.091
60	940	$3.33 \cdot 10^{-5}$	16.64	60.7	757.4	761.2	0.057	42.944



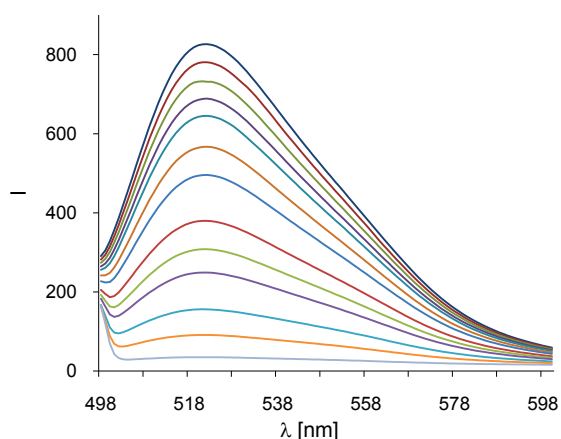
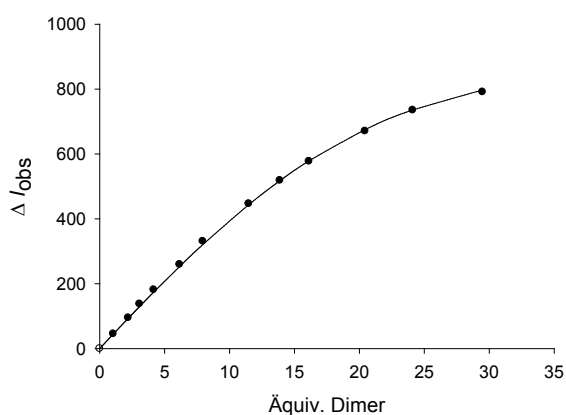
$$K_a = 7.0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (58\%)}$$

Stöchiometrie = 12:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 55 mit 20 BP (GC) DNA

Rezeptor	Dimer 55	M (55) [g/mol]	2320.30
DNA	20 BP (GC) [Fl]-DNA	m (55) [mg]	0.392
T [°C]	25	V (55) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[55] ₀ [mol/L]	$1.69 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[55] [mol/L]	[55] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	826.4	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$2.10 \cdot 10^{-6}$	1.05	780.8	45.6	45.0	0.488	22.251
10	720	$4.40 \cdot 10^{-6}$	2.20	731.5	94.9	93.5	0.313	29.664
10	730	$6.14 \cdot 10^{-6}$	3.07	688.8	137.6	129.7	0.246	33.794
10	740	$8.33 \cdot 10^{-6}$	4.17	645.0	181.4	174.4	0.194	35.109
20	760	$1.23 \cdot 10^{-5}$	6.16	567.1	259.3	253.2	0.140	36.231
20	780	$1.59 \cdot 10^{-5}$	7.94	495.7	330.7	320.7	0.112	36.984
40	820	$2.30 \cdot 10^{-5}$	11.48	379.7	446.7	443.7	0.080	35.801
30	850	$2.78 \cdot 10^{-5}$	13.88	308.0	518.4	517.6	0.067	34.850
30	880	$3.22 \cdot 10^{-5}$	16.12	249.0	577.4	578.9	0.058	33.725
60	940	$4.09 \cdot 10^{-5}$	20.44	156.0	670.4	674.9	0.047	31.271
60	1000	$4.82 \cdot 10^{-5}$	24.11	91.2	735.2	735.5	0.040	29.282
100	1100	$5.90 \cdot 10^{-5}$	29.48	35.1	791.3	797.4	0.033	25.959



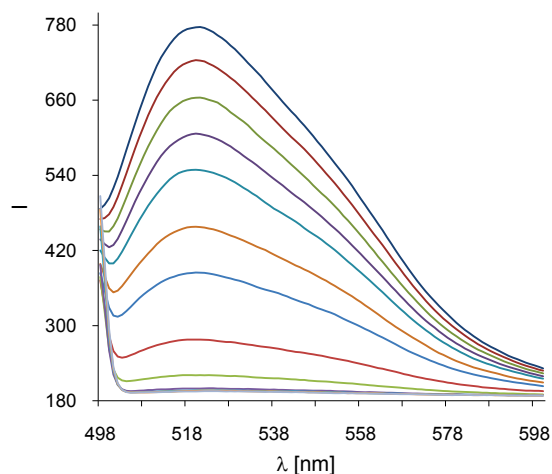
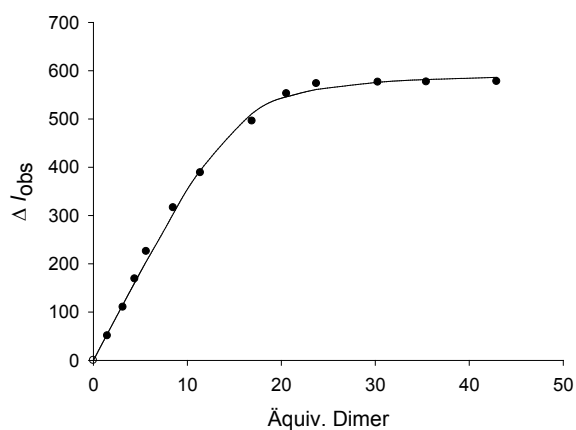
$$K_a = 1.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (19\%)}$$

Stöchiometrie = 20:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 79 mit 20 BP (GC) DNA

Rezeptor	Dimer 79	M (79) [g/mol]	2598.56
DNA	20 BP (GC) [Fl]-DNA	m (79) [mg]	0.629
T [°C]	25	V (79) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[79] ₀ [mol/L]	$2.42 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[79] [mol/L]	[79] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	772.9	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.01 \cdot 10^{-6}$	1.51	722.0	50.9	55.7	0.399	20.313
10	720	$6.31 \cdot 10^{-6}$	3.16	662.9	110.0	116.2	0.241	26.470
10	730	$8.82 \cdot 10^{-6}$	4.41	604.3	168.6	161.5	0.185	31.178
10	740	$1.13 \cdot 10^{-5}$	5.63	547.4	225.5	205.2	0.151	33.994
20	760	$1.70 \cdot 10^{-5}$	8.51	456.7	316.2	303.9	0.105	33.264
20	780	$2.28 \cdot 10^{-5}$	11.39	384.3	388.6	393.9	0.081	31.351
40	820	$3.38 \cdot 10^{-5}$	16.89	277.5	495.4	511.3	0.056	27.689
30	850	$4.11 \cdot 10^{-5}$	20.57	220.7	552.2	546.0	0.046	25.604
30	880	$4.75 \cdot 10^{-5}$	23.75	199.8	573.1	561.2	0.040	23.159
60	940	$6.06 \cdot 10^{-5}$	30.29	196.7	576.2	576.0	0.032	18.413
60	1000	$7.09 \cdot 10^{-5}$	35.45	196.3	576.6	581.7	0.027	15.821
100	1100	$8.59 \cdot 10^{-5}$	42.93	195.3	577.6	586.4	0.023	13.149



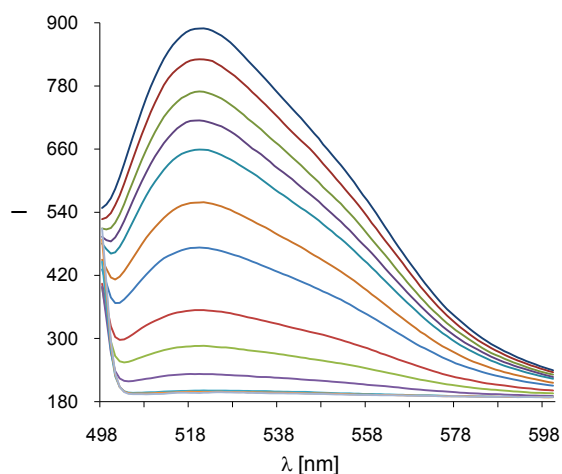
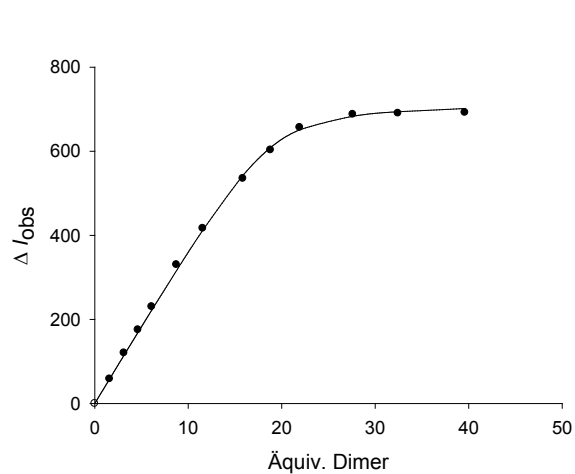
$$K_a = 7.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (28\%)}$$

Stöchiometrie = 16:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 80 mit 20 BP (GC) DNA

Rezeptor	Dimer 80	M (80) [g/mol]	2536.49
DNA	20 BP (GC) [Fl]-DNA	m (80) [mg]	0.576
T [°C]	25	V (80) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[80] ₀ [mol/L]	$2.27 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[80] [mol/L]	[80] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	889.1	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.17 \cdot 10^{-6}$	1.59	830.7	58.4	58.3	0.387	22.576
10	720	$6.26 \cdot 10^{-6}$	3.13	768.8	120.3	114.8	0.242	29.130
10	730	$9.26 \cdot 10^{-6}$	4.63	713.7	175.4	169.3	0.178	31.150
10	740	$1.22 \cdot 10^{-5}$	6.09	658.7	230.4	222.0	0.141	32.489
20	760	$1.75 \cdot 10^{-5}$	8.75	558.9	330.2	316.1	0.103	33.878
20	780	$2.31 \cdot 10^{-5}$	11.56	472.4	416.7	412.3	0.080	33.169
40	820	$3.17 \cdot 10^{-5}$	15.85	353.9	535.2	542.4	0.059	31.769
30	850	$3.76 \cdot 10^{-5}$	18.80	286.1	603.0	608.7	0.051	30.455
30	880	$4.39 \cdot 10^{-5}$	21.93	232.4	656.7	651.1	0.044	28.640
60	940	$5.52 \cdot 10^{-5}$	27.61	201.3	687.8	683.3	0.035	24.043
60	1000	$6.49 \cdot 10^{-5}$	32.44	198.6	690.5	694.0	0.030	20.648
100	1100	$7.92 \cdot 10^{-5}$	39.59	196.9	692.2	701.7	0.025	17.052



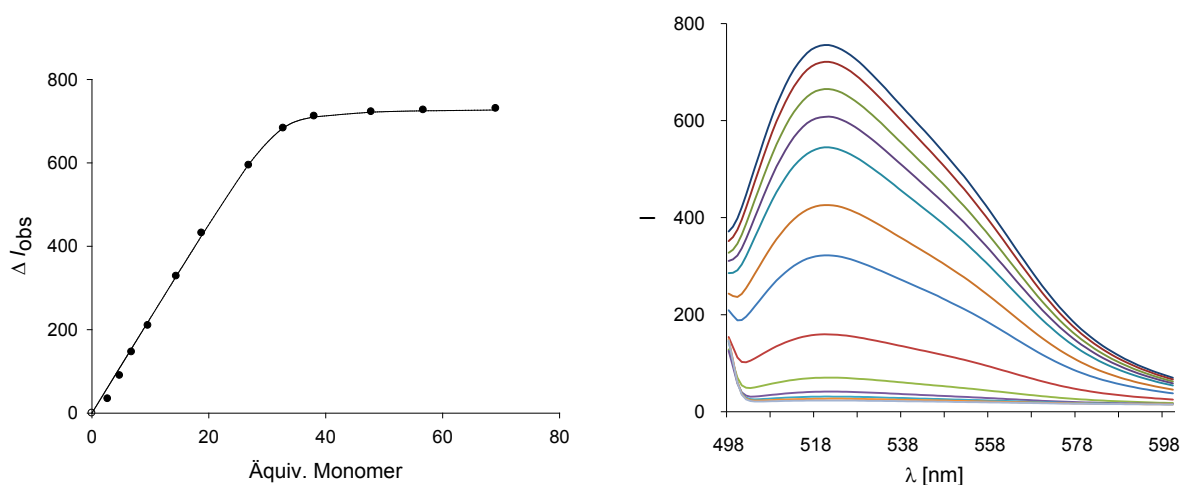
$$K_a = 1.0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (21\%)}$$

Stöchiometrie = 19:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Monomer M1 mit 20 BP (GC) DNA

Rezeptor	Monomer M1	M (M1) [g/mol]	854.824
DNA	20 BP (GC) [Fl]-DNA	m (M1) [mg]	0.328
T [°C]	25	V (M1) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[M1] ₀ [mol/L]	$3.84 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[M1] [mol/L]	[M1] / [DNA]	I _{519 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	753.6	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$5.43 \cdot 10^{-6}$	2.71	719.3	34.3	62.0	0.269	9.233
10	720	$9.55 \cdot 10^{-6}$	4.77	663.7	89.9	109.0	0.173	15.570
10	730	$1.36 \cdot 10^{-5}$	6.79	607.2	146.4	155.0	0.128	18.797
10	740	$1.92 \cdot 10^{-5}$	9.59	543.6	210.0	218.8	0.094	19.825
20	760	$2.89 \cdot 10^{-5}$	14.43	425.3	328.3	328.3	0.065	21.275
20	780	$3.75 \cdot 10^{-5}$	18.77	321.7	431.9	425.4	0.051	21.845
40	820	$5.37 \cdot 10^{-5}$	26.84	159.2	594.4	596.5	0.036	21.348
30	850	$6.55 \cdot 10^{-5}$	32.74	70.4	683.2	683.7	0.030	20.251
30	880	$7.61 \cdot 10^{-5}$	38.03	41.6	712.0	710.1	0.026	18.244
60	940	$9.56 \cdot 10^{-5}$	47.79	31.2	722.4	721.7	0.020	14.806
60	1000	$1.13 \cdot 10^{-4}$	56.69	27.0	726.6	724.8	0.017	12.594
100	1100	$1.38 \cdot 10^{-4}$	69.11	23.1	730.5	726.8	0.014	10.420



$$K_a = 2.4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (22\%)}$$

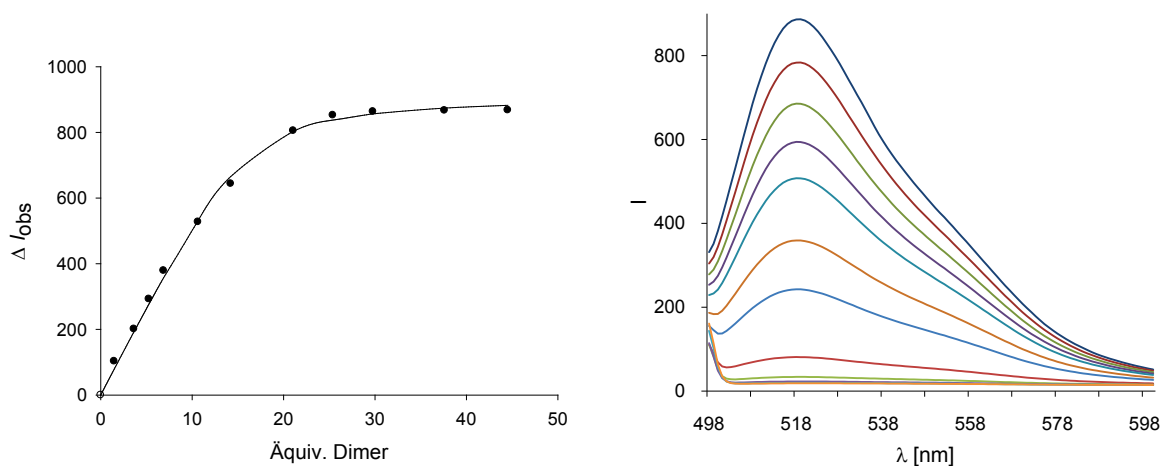
Stöchiometrie = 32:1 (Rezeptor : DNA)

5.4.1.7 Fluoreszenztitrationen mit 20 BP RNA

Fluoreszenztitration von Dimer 1 mit 20 BP RNA

Rezeptor	Dimer 1	M (1) [g/mol]	2212.22
DNA	20 BP [6-FAM]-RNA	m (1) [mg]	0.699
T [°C]	25	V (1) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[1] ₀ [mol/L]	3.16·10 ⁻⁴
		[RNA] ₀ [mol/L]	2.00·10 ⁻⁶

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[1] [mol/L]	[1] / [RNA]	I _{519 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	886.4	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	2.95·10 ⁻⁶	1.47	783.4	103.0	78.9	0.404	41.629
10	720	7.27·10 ⁻⁶	3.63	685.1	201.3	192.6	0.216	43.434
10	730	1.06·10 ⁻⁵	5.27	594.0	292.4	277.0	0.159	46.604
10	740	1.38·10 ⁻⁵	6.88	507.4	379.0	357.3	0.127	48.101
20	760	2.13·10 ⁻⁵	10.64	359.0	527.4	531.3	0.086	45.308
20	780	2.84·10 ⁻⁵	14.22	242.6	643.8	665.4	0.066	42.303
40	820	4.21·10 ⁻⁵	21.06	81.1	805.3	803.1	0.045	36.497
30	850	5.08·10 ⁻⁵	25.39	33.9	852.5	837.6	0.038	32.299
30	880	5.96·10 ⁻⁵	29.79	23.0	863.4	856.5	0.032	28.045
60	940	7.52·10 ⁻⁵	37.61	19.8	866.6	874.0	0.026	22.447
60	1000	8.91·10 ⁻⁵	44.53	18.7	867.7	882.3	0.022	19.059



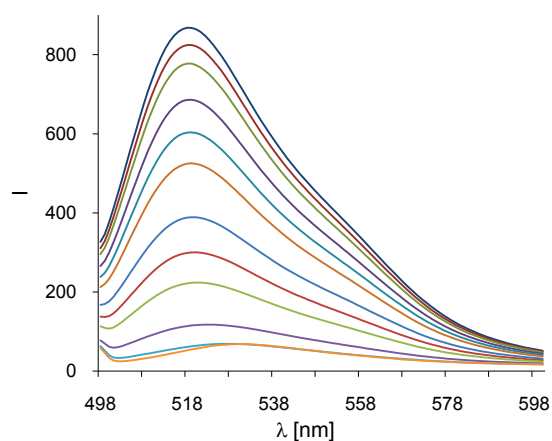
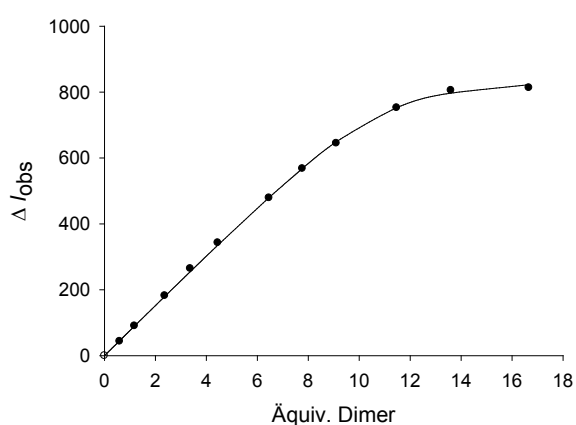
$$K_a = 5.4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (24\%)}$$

Stöchiometrie = 16:1 (Rezeptor : RNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 7 mit 20 BP RNA

Rezeptor	Dimer 7	M (7) [g/mol]	1999.09
DNA	20 BP [6-FAM]-RNA	m (7) [mg]	0.191
T [°C]	25	V (7) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[7] ₀ [mol/L]	$9.55 \cdot 10^{-5}$
		[RNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[7] [mol/L]	[7] / [RNA]	I _{519 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	867.9	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$1.19 \cdot 10^{-6}$	0.60	824.5	43.4	45.5	0.626	27.189
10	720	$2.36 \cdot 10^{-6}$	1.18	777.4	90.5	89.8	0.459	41.557
10	740	$4.73 \cdot 10^{-6}$	2.37	686.0	181.9	179.9	0.297	54.023
20	760	$6.73 \cdot 10^{-6}$	3.37	603.5	264.4	255.0	0.229	60.543
20	780	$8.90 \cdot 10^{-6}$	4.45	525.2	342.7	335.2	0.184	62.896
40	820	$1.29 \cdot 10^{-5}$	6.46	389.1	478.8	480.0	0.134	64.174
30	850	$1.55 \cdot 10^{-5}$	7.77	300.1	567.8	568.6	0.114	64.726
30	880	$1.82 \cdot 10^{-5}$	9.10	223.4	644.5	649.4	0.099	63.797
60	940	$2.29 \cdot 10^{-5}$	11.47	115.3	752.6	752.5	0.080	60.354
60	1000	$2.72 \cdot 10^{-5}$	13.60	62.7	805.2	797.0	0.068	55.140
100	1100	$3.33 \cdot 10^{-5}$	16.66	54.6	813.3	822.6	0.057	46.050



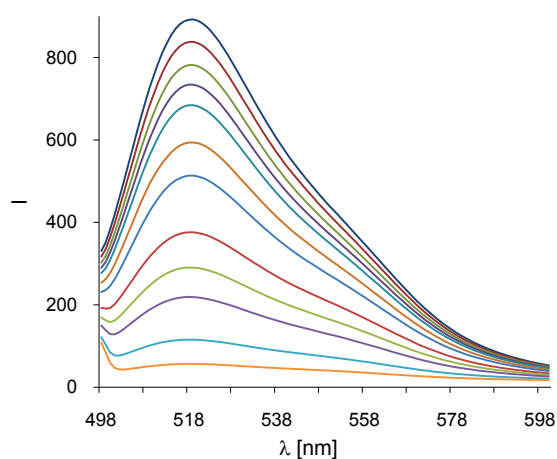
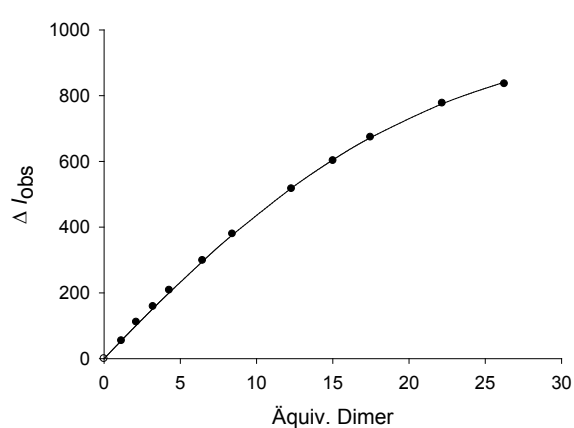
$$K_a = 1.9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (23\%)}$$

Stöchiometrie = 11:1 (Rezeptor : RNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 55 mit 20 BP RNA

Rezeptor	Dimer 55	M (55) [g/mol]	2320.30
DNA	20 BP [6-FAM]-RNA	m (55) [mg]	0.425
T [°C]	25	V (55) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[55] ₀ [mol/L]	$1.83 \cdot 10^{-4}$
		[RNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[55] [mol/L]	[55] / [RNA]	I _{519 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	892.4	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$2.29 \cdot 10^{-6}$	1.14	838.1	54.3	55.4	0.466	25.317
10	720	$4.25 \cdot 10^{-6}$	2.12	781.6	110.8	101.8	0.320	35.476
10	730	$6.43 \cdot 10^{-6}$	3.22	733.8	158.6	152.6	0.237	37.620
10	740	$8.56 \cdot 10^{-6}$	4.28	684.2	208.2	201.1	0.189	39.416
20	760	$1.29 \cdot 10^{-5}$	6.46	593.9	298.5	296.2	0.134	39.988
20	780	$1.68 \cdot 10^{-5}$	8.42	513.2	379.2	376.4	0.106	40.249
40	820	$2.46 \cdot 10^{-5}$	12.29	375.7	516.7	519.0	0.075	38.865
30	850	$3.00 \cdot 10^{-5}$	15.02	290.1	602.3	605.2	0.062	37.593
30	880	$3.49 \cdot 10^{-5}$	17.47	218.7	673.7	672.3	0.054	36.471
60	940	$4.44 \cdot 10^{-5}$	22.18	115.2	777.2	775.4	0.043	33.526
60	1000	$5.25 \cdot 10^{-5}$	26.26	56.4	836.0	841.2	0.037	30.673



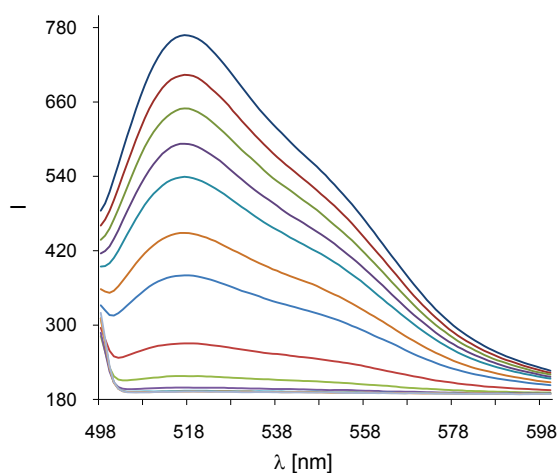
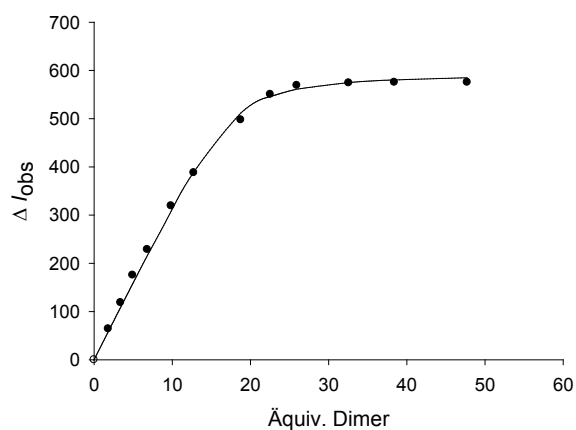
$$K_a = 1.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (20\%)}$$

Stöchiometrie = 19:1 (Rezeptor : RNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 79 mit 20 BP RNA

Rezeptor	Dimer 79	M (79) [g/mol]	2598.56
DNA	20 BP [6-FAM]-RNA	m (79) [mg]	0.674
T [°C]	25	V (79) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[79] ₀ [mol/L]	2.59·10 ⁻⁴
		[RNA] ₀ [mol/L]	2.00·10 ⁻⁶

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[79] [mol/L]	[79] / [RNA]	I _{519 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	768.0	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	3.64·10 ⁻⁶	1.82	703.9	64.1	58.6	0.354	22.723
10	720	6.79·10 ⁻⁶	3.40	649.5	118.5	108.9	0.227	26.950
10	730	9.87·10 ⁻⁶	4.93	592.6	175.4	157.6	0.168	29.554
10	740	1.36·10 ⁻⁵	6.81	539.4	228.6	215.9	0.128	29.288
20	760	1.97·10 ⁻⁵	9.86	448.8	319.2	308.2	0.092	29.394
20	780	2.55·10 ⁻⁵	12.77	380.1	387.9	389.7	0.073	28.180
40	820	3.76·10 ⁻⁵	18.78	270.4	497.6	511.7	0.051	25.160
30	850	4.51·10 ⁻⁵	22.55	217.6	550.4	546.1	0.042	23.375
30	880	5.19·10 ⁻⁵	25.94	199.2	568.8	561.3	0.037	21.116
60	940	6.52·10 ⁻⁵	32.58	193.9	574.1	574.9	0.030	17.099
60	1000	7.68·10 ⁻⁵	38.42	192.6	575.4	580.4	0.025	14.598
100	1100	9.55·10 ⁻⁵	47.72	192.6	575.4	585.0	0.021	11.809



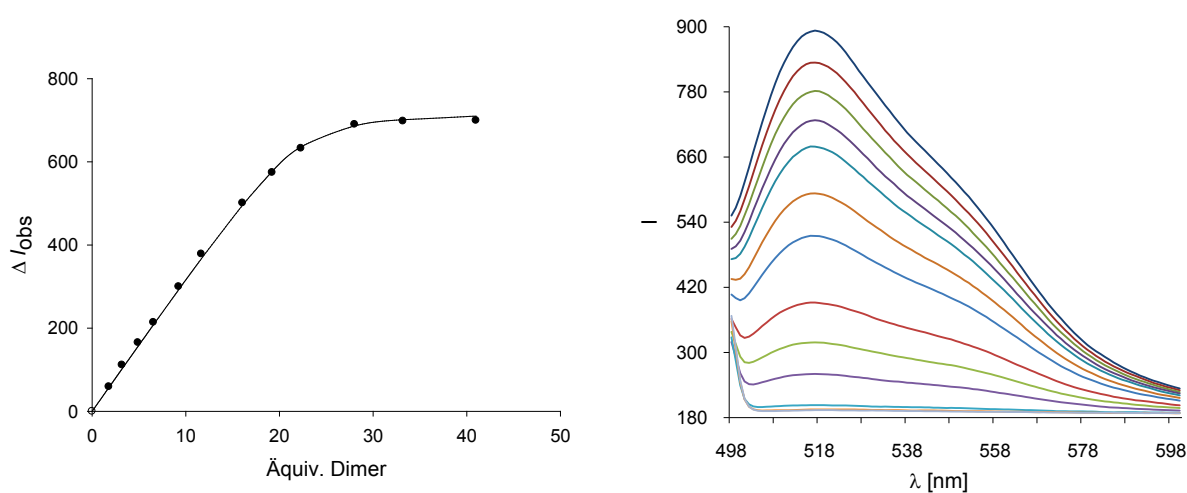
$$K_a = 8.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (29\%)}$$

Stöchiometrie = 18:1 (Rezeptor : RNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 80 mit 20 BP RNA

Rezeptor	Dimer 80	M (80) [g/mol]	2536.49
DNA	20 BP [6-FAM]-RNA	m (80) [mg]	0.592
T [°C]	25	V (80) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[80] ₀ [mol/L]	$2.33 \cdot 10^{-4}$
		[RNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[80] [mol/L]	[80] / [RNA]	I _{519 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	893.0	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.60 \cdot 10^{-6}$	1.80	833.9	59.1	57.5	0.357	21.121
10	720	$6.39 \cdot 10^{-6}$	3.20	781.8	111.2	102.1	0.238	26.494
10	730	$9.80 \cdot 10^{-6}$	4.90	727.8	165.2	156.1	0.170	28.006
10	740	$1.31 \cdot 10^{-5}$	6.55	679.3	213.7	208.2	0.132	28.304
20	760	$1.85 \cdot 10^{-5}$	9.25	593.2	299.8	292.7	0.098	29.254
20	780	$2.33 \cdot 10^{-5}$	11.67	514.6	378.4	367.2	0.079	29.867
40	820	$3.21 \cdot 10^{-5}$	16.06	392.1	500.9	496.0	0.059	29.355
30	850	$3.84 \cdot 10^{-5}$	19.22	318.7	574.3	577.1	0.049	28.402
30	880	$4.46 \cdot 10^{-5}$	22.31	260.5	632.5	636.3	0.043	27.140
60	940	$5.61 \cdot 10^{-5}$	28.03	203.1	689.9	686.6	0.034	23.766
60	1000	$6.64 \cdot 10^{-5}$	33.19	195.2	697.8	701.4	0.029	20.408
100	1100	$8.20 \cdot 10^{-5}$	40.99	193.8	699.2	710.3	0.024	16.651



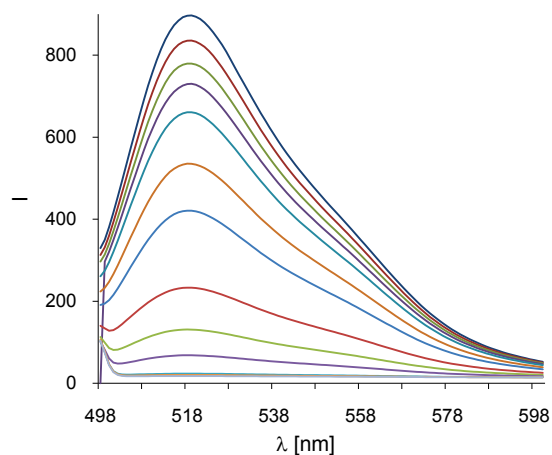
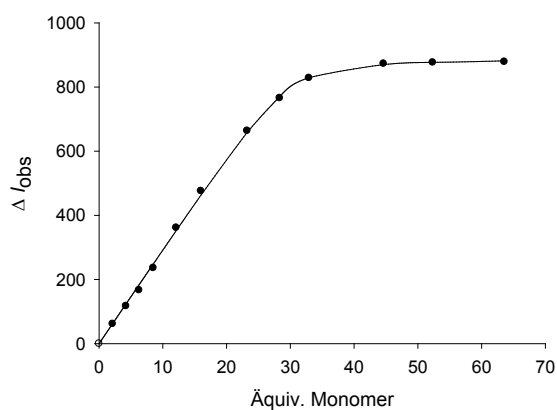
$$K_a = 1.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (27\%)}$$

Stöchiometrie = 22:1 (Rezeptor : RNA)

Fluoreszenztitration von Monomer M1 mit 20 BP RNA

Rezeptor	Monomer M1	M (M1) [g/mol]	854.824
DNA	20 BP [6-FAM]-RNA	m (M1) [mg]	0.295
T [°C]	25	V (M1) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[M1] ₀ [mol/L]	$3.45 \cdot 10^{-4}$
		[RNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[M1] [mol/L]	[M1] / [RNA]	I _{519 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	896.6	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$4.29 \cdot 10^{-6}$	2.14	835.4	61.2	62.8	0.318	19.469
10	720	$8.47 \cdot 10^{-6}$	4.23	779.4	117.2	124.0	0.191	22.391
10	730	$1.26 \cdot 10^{-5}$	6.27	730.2	166.4	183.5	0.137	22.874
10	740	$1.70 \cdot 10^{-5}$	8.51	660.8	235.8	248.6	0.105	24.791
20	760	$2.42 \cdot 10^{-5}$	12.11	535.1	361.5	352.5	0.076	27.577
20	780	$3.20 \cdot 10^{-5}$	16.00	420.8	475.8	463.3	0.059	27.989
40	820	$4.64 \cdot 10^{-5}$	23.24	232.9	663.7	658.8	0.041	27.379
30	850	$5.67 \cdot 10^{-5}$	28.34	131.0	765.6	770.6	0.034	26.092
30	880	$6.59 \cdot 10^{-5}$	32.93	68.3	828.3	829.1	0.029	24.412
60	940	$8.93 \cdot 10^{-5}$	44.65	23.7	872.9	870.0	0.022	19.123
60	1000	$1.05 \cdot 10^{-4}$	52.35	20.2	876.4	876.9	0.019	16.427
100	1100	$1.27 \cdot 10^{-4}$	63.57	17.8	878.8	881.6	0.015	13.610



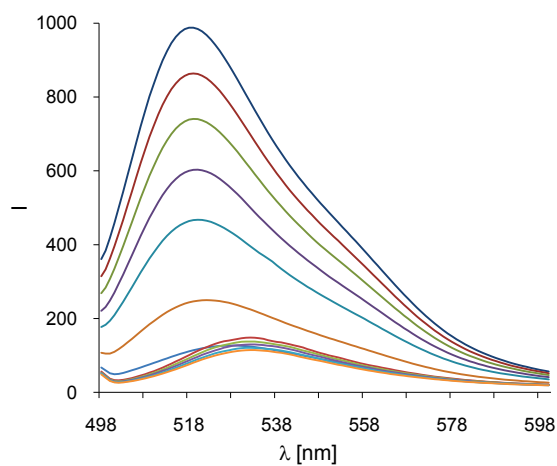
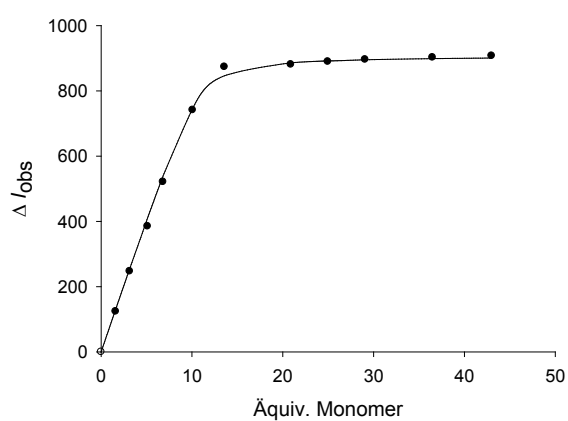
$$K_a = 1.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (25\%)}$$

Stöchiometrie = 30:1 (Rezeptor : RNA)

Fluoreszenztitration von Monomer M7 mit 20 BP RNA

Rezeptor	Monomer M7	M (M7) [g/mol]	1022.94
DNA	20 BP [6-FAM]-RNA	m (M7) [mg]	0.294
T [°C]	25	V (M7) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[M7] ₀ [mol/L]	$2.87 \cdot 10^{-4}$
		[RNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[M7] [mol/L]	[M7] / [RNA]	I _{519 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	987.7	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.19 \cdot 10^{-6}$	1.60	863.7	124.0	130.0	0.385	47.753
10	720	$6.32 \cdot 10^{-6}$	3.16	740.5	247.2	255.9	0.240	59.447
10	730	$1.02 \cdot 10^{-5}$	5.12	602.8	384.9	410.6	0.163	62.929
10	740	$1.36 \cdot 10^{-5}$	6.81	466.6	521.1	539.0	0.128	66.708
20	760	$2.02 \cdot 10^{-5}$	10.08	246.4	741.3	746.2	0.090	66.900
20	780	$2.72 \cdot 10^{-5}$	13.58	114.1	873.6	846.2	0.069	59.932
40	820	$4.18 \cdot 10^{-5}$	20.90	106.9	880.8	885.9	0.046	40.228
30	850	$4.99 \cdot 10^{-5}$	24.97	98.0	889.7	891.9	0.039	34.263
30	880	$5.81 \cdot 10^{-5}$	29.07	91.7	896.0	895.3	0.033	29.795
60	940	$7.30 \cdot 10^{-5}$	36.49	85.3	902.4	898.7	0.027	24.074
60	1000	$8.60 \cdot 10^{-5}$	43.00	80.3	907.4	900.5	0.023	20.624



$$K_a = 2.0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (26\%)}$$

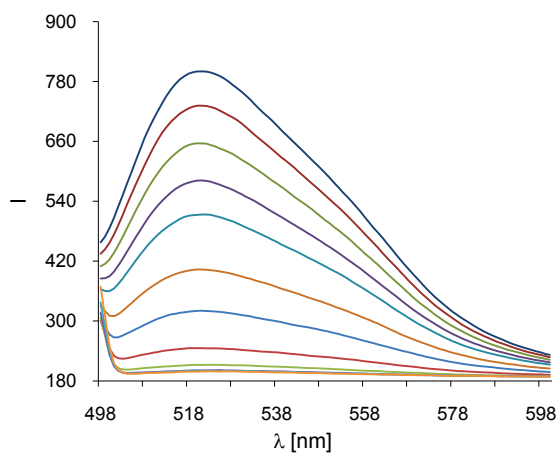
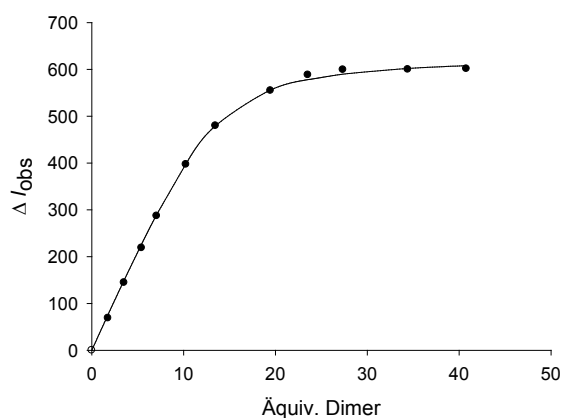
Stöchiometrie = 11:1 (Rezeptor : RNA)

5.4.1.8 Fluoreszenztitrationen mit AAT DNA

Fluoreszenztitration von Dimer 1 mit AAT DNA

Rezeptor	Dimer 1	M (1) [g/mol]	2212.22
DNA	12 BP (AAT) [Fl]-DNA	m (1) [mg]	0.634
T [°C]	25	V (1) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[1] ₀ [mol/L]	$2.87 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[1] [mol/L]	[1] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	800.3	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.56 \cdot 10^{-6}$	1.78	731.6	68.7	76.6	0.360	24.712
10	720	$7.03 \cdot 10^{-6}$	3.52	655.7	144.6	149.6	0.221	32.016
10	730	$1.08 \cdot 10^{-5}$	5.42	581.6	218.7	226.7	0.156	34.067
10	740	$1.41 \cdot 10^{-5}$	7.07	513.4	286.9	290.1	0.124	35.559
20	760	$2.05 \cdot 10^{-5}$	10.25	403.3	397.0	398.3	0.089	35.288
20	780	$2.69 \cdot 10^{-5}$	13.47	320.6	479.7	479.8	0.069	33.146
40	820	$3.89 \cdot 10^{-5}$	19.47	245.7	554.6	556.4	0.049	27.094
30	850	$4.71 \cdot 10^{-5}$	23.54	212.1	588.2	578.2	0.041	23.972
30	880	$5.47 \cdot 10^{-5}$	27.35	201.0	599.3	590.0	0.035	21.142
60	940	$6.88 \cdot 10^{-5}$	34.41	200.5	599.8	602.1	0.028	16.938
60	1000	$8.16 \cdot 10^{-5}$	40.78	199.1	601.2	608.2	0.024	14.390



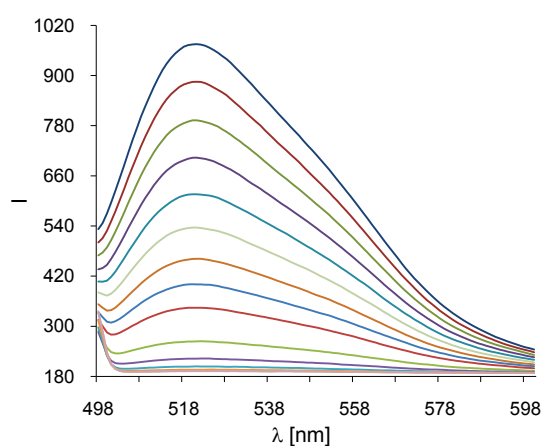
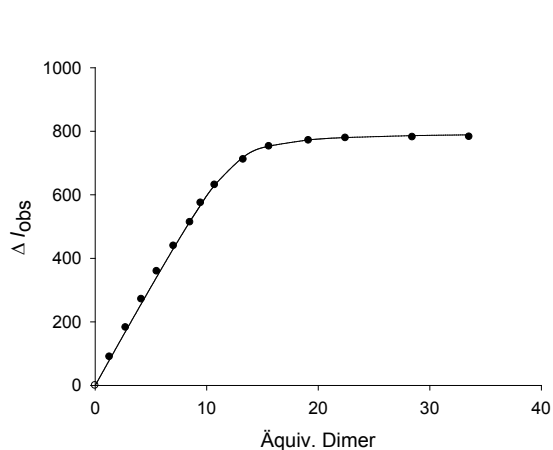
$$K_a = 5.0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (12\%)}$$

Stöchiometrie = 14:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 79 mit AAT DNA

Rezeptor	Dimer 79	M (79) [g/mol]	2598.56
DNA	12 BP (AAT) [Fl]-DNA	m (79) [mg]	0.617
T [°C]	25	V (79) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[79] ₀ [mol/L]	$2.37 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[79] [mol/L]	[79] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	975.1	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$2.59 \cdot 10^{-6}$	1.29	885.1	90.0	81.0	0.436	39.225
10	720	$5.48 \cdot 10^{-6}$	2.74	792.9	182.2	170.9	0.267	48.721
10	730	$8.30 \cdot 10^{-6}$	4.15	703.6	271.5	257.9	0.194	52.721
10	740	$1.11 \cdot 10^{-5}$	5.53	615.8	359.3	341.9	0.153	55.057
10	750	$1.41 \cdot 10^{-5}$	7.04	536.0	439.1	432.1	0.124	54.647
10	760	$1.70 \cdot 10^{-5}$	8.50	461.6	513.5	516.6	0.105	54.026
10	770	$1.89 \cdot 10^{-5}$	9.46	400.4	574.7	568.7	0.096	54.926
10	780	$2.14 \cdot 10^{-5}$	10.72	344.1	631.0	630.6	0.085	53.861
20	800	$2.66 \cdot 10^{-5}$	13.28	263.9	711.2	718.9	0.070	49.792
20	820	$3.12 \cdot 10^{-5}$	15.59	222.5	752.6	753.4	0.060	45.362
30	850	$3.83 \cdot 10^{-5}$	19.13	203.9	771.2	772.9	0.050	38.305
30	880	$4.49 \cdot 10^{-5}$	22.44	196.1	779.0	780.2	0.043	33.234
40	920	$5.69 \cdot 10^{-5}$	28.44	193.6	781.5	786.2	0.034	26.549
80	1000	$6.71 \cdot 10^{-5}$	33.54	192.7	782.4	788.8	0.029	22.654



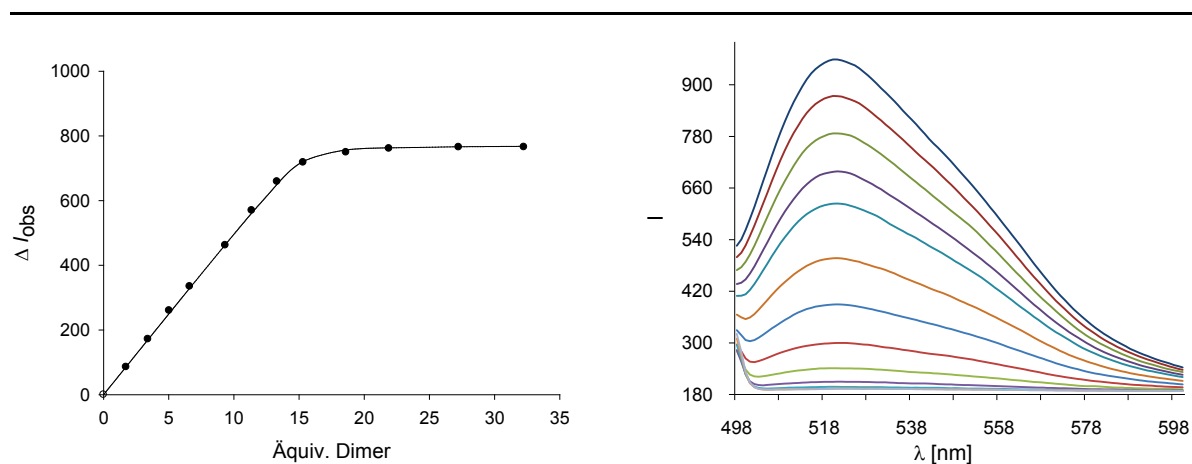
$$K_a = 2.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (21\%)}$$

Stöchiometrie = 13:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 80 mit AAT DNA

Rezeptor	Dimer 80	M (80) [g/mol]	2536.49
DNA	12 BP (AAT) [Fl]-DNA	m (80) [mg]	0.567
T [°C]	25	V (80) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[80] ₀ [mol/L]	$2.24 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[80] [mol/L]	[80] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	958.9	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.46 \cdot 10^{-6}$	1.73	873.7	85.2	86.5	0.366	31.207
10	720	$6.82 \cdot 10^{-6}$	3.41	787.1	171.8	170.2	0.227	38.978
10	730	$1.01 \cdot 10^{-5}$	5.03	698.8	260.1	251.2	0.166	43.101
10	740	$1.32 \cdot 10^{-5}$	6.61	624.1	334.8	329.7	0.131	43.974
20	760	$1.87 \cdot 10^{-5}$	9.34	497.0	461.9	464.1	0.097	44.667
20	780	$2.27 \cdot 10^{-5}$	11.37	389.4	569.5	562.0	0.081	46.053
20	800	$2.66 \cdot 10^{-5}$	13.31	299.9	659.0	650.8	0.070	46.042
20	820	$3.06 \cdot 10^{-5}$	15.32	240.9	718.0	721.4	0.061	44.003
30	850	$3.72 \cdot 10^{-5}$	18.60	209.6	749.3	756.8	0.051	38.222
30	880	$4.38 \cdot 10^{-5}$	21.90	197.7	761.2	763.4	0.044	33.238
40	920	$5.45 \cdot 10^{-5}$	27.24	193.7	765.2	766.6	0.035	27.092
80	1000	$6.45 \cdot 10^{-5}$	32.26	193.3	765.6	767.9	0.030	23.022



$$K_a = 7.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (29\%)}$$

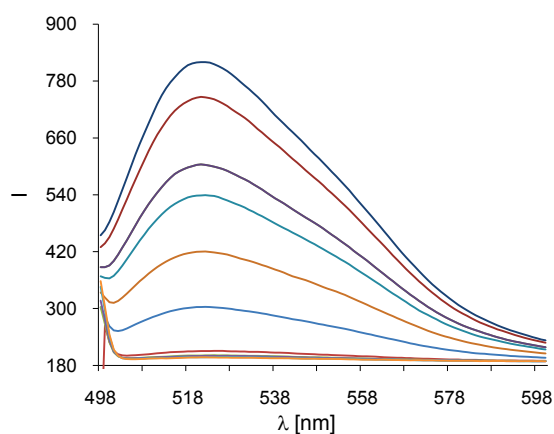
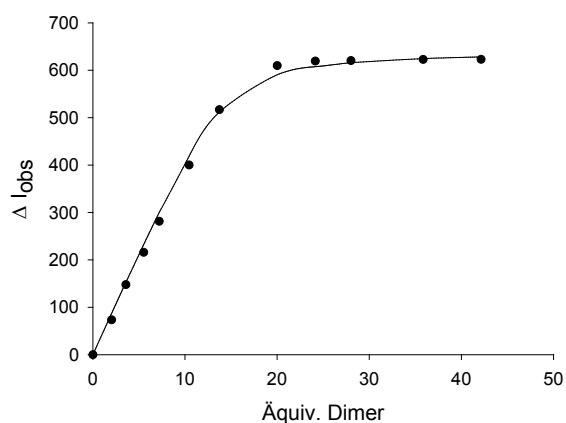
Stöchiometrie = 15:1 (Rezeptor : DNA)

5.4.1.9 Fluoreszenztitrationen mit AAC DNA

Fluoreszenztitration von Dimer 1 mit AAC DNA

Rezeptor	Dimer 1	M (1) [g/mol]	2212.22
DNA	12 BP (AAC) [Fl]-DNA	m (1) [mg]	0.646
T [°C]	25	V (1) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[1] ₀ [mol/L]	$2.92 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[1] [mol/L]	[1] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	820.1	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$4.08 \cdot 10^{-6}$	2.04	746.5	73.6	87.2	0.329	24.232
10	720	$7.17 \cdot 10^{-6}$	3.58	672.3	147.8	152.5	0.218	32.250
10	730	$1.10 \cdot 10^{-5}$	5.52	604.3	215.8	232.7	0.153	33.087
10	740	$1.44 \cdot 10^{-5}$	7.20	538.7	281.4	299.9	0.122	34.308
20	760	$2.09 \cdot 10^{-5}$	10.44	420.0	400.1	418.9	0.087	34.961
20	780	$2.75 \cdot 10^{-5}$	13.73	303.3	516.8	511.8	0.068	35.092
40	820	$4.00 \cdot 10^{-5}$	20.01	210.2	609.9	590.7	0.048	29.030
30	850	$4.83 \cdot 10^{-5}$	24.14	200.8	619.3	607.7	0.040	24.631
30	880	$5.60 \cdot 10^{-5}$	28.01	199.8	620.3	616.0	0.034	21.379
60	940	$7.17 \cdot 10^{-5}$	35.85	197.2	622.9	624.6	0.027	16.903
60	1000	$8.43 \cdot 10^{-5}$	42.14	197.0	623.1	628.2	0.023	14.445



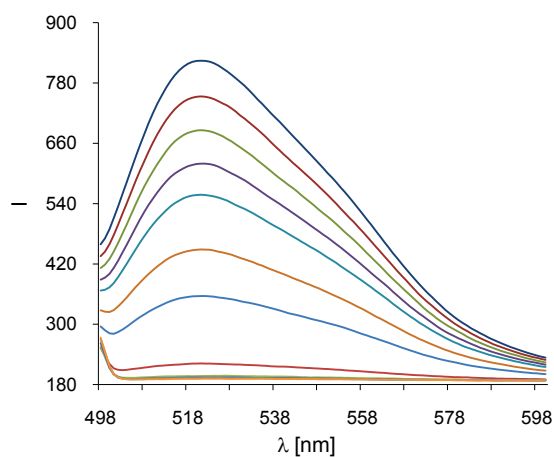
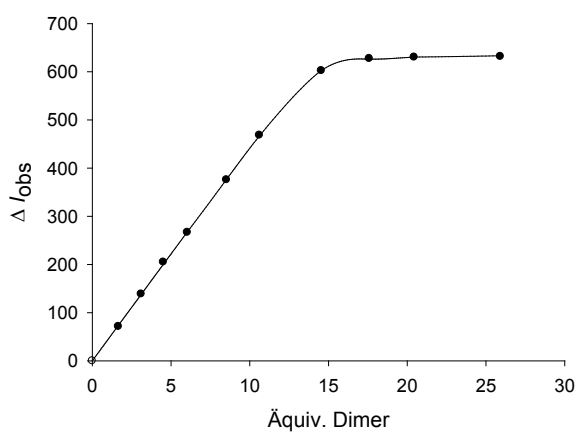
$$K_a = 8.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ (32\%)}$$

Stöchiometrie = 14:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 79 mit AAC DNA

Rezeptor	Dimer 79	M (79) [g/mol]	2598.56
DNA	12 BP (AAC) [Fl]-DNA	m (79) [mg]	0.558
T [°C]	25	V (79) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[79] ₀ [mol/L]	$2.15 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[79] [mol/L]	[79] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	824.4	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.31 \cdot 10^{-6}$	1.66	753.2	71.2	73.7	0.376	26.798
10	720	$6.21 \cdot 10^{-6}$	3.10	685.9	138.5	137.9	0.244	33.739
10	730	$9.03 \cdot 10^{-6}$	4.51	619.5	204.9	200.4	0.181	37.160
10	740	$1.21 \cdot 10^{-5}$	6.04	557.7	266.7	267.6	0.142	37.908
20	760	$1.70 \cdot 10^{-5}$	8.52	448.7	375.7	376.8	0.105	39.459
20	780	$2.12 \cdot 10^{-5}$	10.62	356.1	468.3	466.9	0.086	40.317
40	820	$2.91 \cdot 10^{-5}$	14.55	222.1	602.3	603.0	0.064	38.737
30	850	$3.52 \cdot 10^{-5}$	17.59	197.0	627.4	626.2	0.054	33.750
30	880	$4.09 \cdot 10^{-5}$	20.44	194.1	630.3	630.6	0.047	29.401
60	940	$5.18 \cdot 10^{-5}$	25.92	192.6	631.8	633.2	0.037	23.473



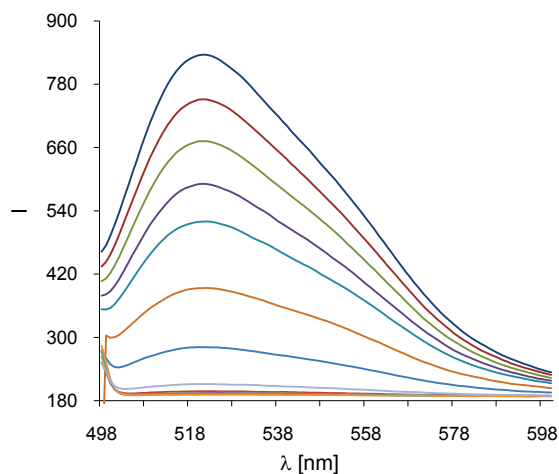
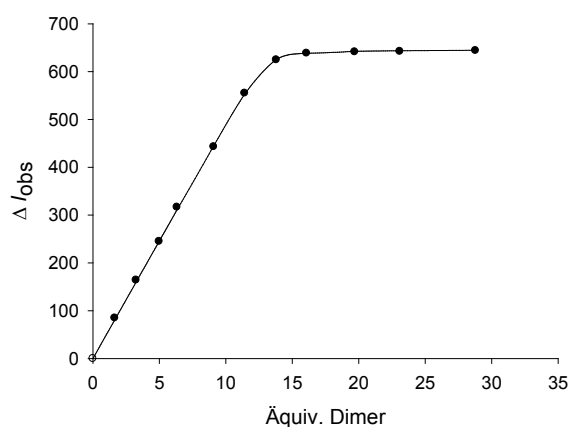
$$K_a = 8.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} (15\%)$$

Stöchiometrie = 14:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 80 mit AAC DNA

Rezeptor	Dimer 80	M (80) [g/mol]	2536.49
DNA	12 BP (AAC) [Fl]-DNA	m (80) [mg]	0.634
T [°C]	25	V (80) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[80] ₀ [mol/L]	$2.40 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[80] [mol/L]	[80] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	836.2	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.29 \cdot 10^{-6}$	1.65	751.4	84.8	81.1	0.378	32.036
10	720	$6.50 \cdot 10^{-6}$	3.25	672.1	164.1	160.0	0.235	38.615
10	730	$9.96 \cdot 10^{-6}$	4.98	591.3	244.9	245.0	0.167	40.952
10	740	$1.27 \cdot 10^{-5}$	6.33	519.7	316.5	311.0	0.136	43.189
20	760	$1.82 \cdot 10^{-5}$	9.09	393.4	442.8	445.1	0.099	43.883
20	780	$2.28 \cdot 10^{-5}$	11.42	281.4	554.8	553.1	0.081	44.673
20	800	$2.76 \cdot 10^{-5}$	13.80	211.6	624.6	625.3	0.068	42.210
20	820	$3.22 \cdot 10^{-5}$	16.07	197.8	638.4	638.5	0.059	37.390
30	850	$3.94 \cdot 10^{-5}$	19.70	194.8	641.4	642.5	0.048	30.981
30	880	$4.62 \cdot 10^{-5}$	23.09	193.8	642.4	643.7	0.042	26.669
60	940	$5.76 \cdot 10^{-5}$	28.79	192.3	643.9	644.6	0.034	21.615



$$K_a = 1.3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ (22\%)}$$

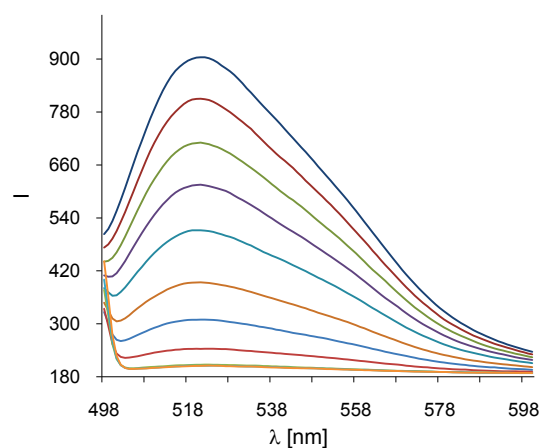
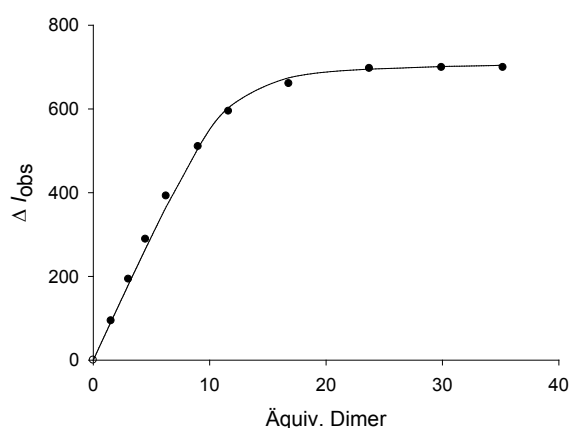
Stöchiometrie = 13:1 (Rezeptor : DNA)

5.4.1.10 Fluoreszenztitrationen mit ATGC DNA

Fluoreszenztitration von Dimer 1 mit ATGC DNA

Rezeptor	Dimer 1	M (1) [g/mol]	2212.22
DNA	12 BP (ATGC) [Fl]-DNA	m (1) [mg]	0.548
T [°C]	25	V (1) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[1] ₀ [mol/L]	$2.48 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[1] [mol/L]	[1] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ·Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	903.9	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.07 \cdot 10^{-6}$	1.54	810.1	93.8	92.2	0.394	36.984
10	720	$6.07 \cdot 10^{-6}$	3.03	710.7	193.2	181.1	0.248	47.883
10	730	$8.99 \cdot 10^{-6}$	4.50	615.2	288.7	266.4	0.182	52.519
10	740	$1.26 \cdot 10^{-5}$	6.28	511.9	392.0	366.8	0.137	53.876
20	760	$1.80 \cdot 10^{-5}$	9.01	393.9	510.0	506.6	0.100	50.927
20	780	$2.33 \cdot 10^{-5}$	11.63	309.6	594.3	603.3	0.079	47.062
40	820	$3.36 \cdot 10^{-5}$	16.81	243.4	660.5	674.5	0.056	37.095
30	880	$4.75 \cdot 10^{-5}$	23.73	207.3	696.6	695.1	0.040	28.164
30	940	$5.99 \cdot 10^{-5}$	29.93	205.0	698.9	701.4	0.032	22.595
60	1000	$7.04 \cdot 10^{-5}$	35.21	204.9	699.0	704.2	0.028	19.305



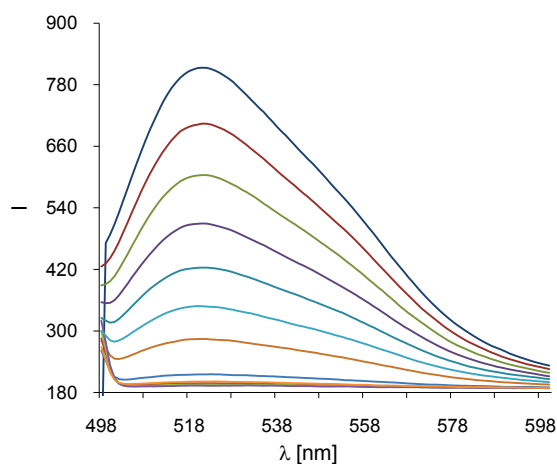
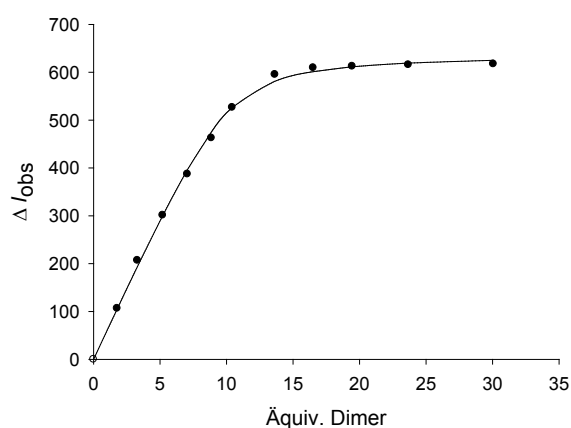
$$K_a = 1.4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (31\%)}$$

Stöchiometrie = 11:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 79 mit ATGC DNA

Rezeptor	Dimer 79	M (79) [g/mol]	2598.56
DNA	12 BP (ATGC) [Fl]-DNA	m (79) [mg]	0.746
T [°C]	25	V (79) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[79] ₀ [mol/L]	$2.87 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[79] [mol/L]	[79] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	810.7	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.56 \cdot 10^{-6}$	1.78	704.2	106.5	105.5	0.360	38.342
10	720	$6.60 \cdot 10^{-6}$	3.30	603.8	206.9	193.8	0.233	48.147
10	730	$1.04 \cdot 10^{-5}$	5.20	509.5	301.2	300.6	0.161	48.550
10	740	$1.41 \cdot 10^{-5}$	7.06	423.5	387.2	396.5	0.124	48.043
10	750	$1.77 \cdot 10^{-5}$	8.87	348.2	462.5	475.4	0.101	46.879
10	760	$2.09 \cdot 10^{-5}$	10.43	284.2	526.5	526.2	0.087	46.056
20	780	$2.73 \cdot 10^{-5}$	13.64	215.3	595.4	581.3	0.068	40.665
20	800	$3.31 \cdot 10^{-5}$	16.52	201.2	609.5	601.2	0.057	34.781
20	820	$3.89 \cdot 10^{-5}$	19.45	198.2	612.5	611.4	0.049	29.951
30	850	$4.74 \cdot 10^{-5}$	23.67	195.2	615.5	619.1	0.041	24.946
50	900	$6.01 \cdot 10^{-5}$	30.06	193.4	617.3	625.0	0.032	19.874



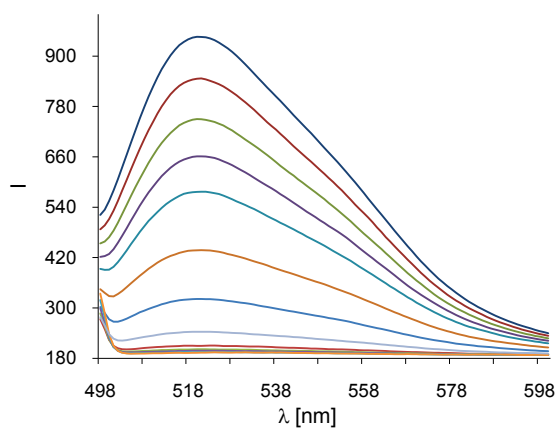
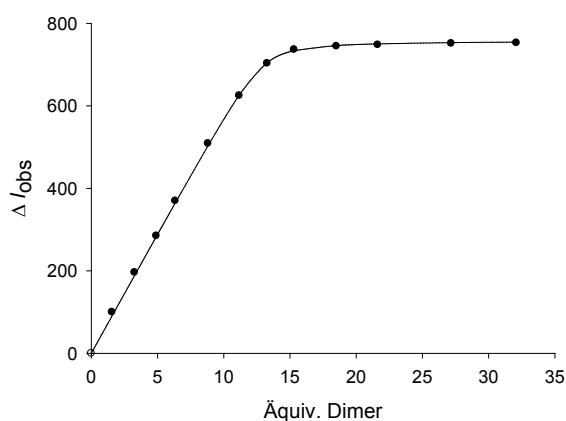
$$K_a = 1.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (19\%)}$$

Stöchiometrie = 10:1 (Rezeptor : DNA)

Fluoreszenztitration von Dimer 80 mit ATGC DNA

Rezeptor	Dimer 80	M (80) [g/mol]	2536.49
DNA	12 BP (ATGC) [Fl]-DNA	m (80) [mg]	0.574
T [°C]	25	V (80) [mL]	1.0
Lösungsmittel	1 mM Hepes (H ₂ O / MeOH 1:1). pH 7.1	[80] ₀ [mol/L]	$2.26 \cdot 10^{-4}$
		[DNA] ₀ [mol/L]	$2.00 \cdot 10^{-6}$

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[80] [mol/L]	[80] / [DNA]	I _{522 nm}	Δ I _{obs}	Δ I _{ber}	χ	χ · Δ I _{obs}
0	700	0	0.00	946.0	0.0	0.0	1.000	0.000
10	710	$3.14 \cdot 10^{-6}$	1.57	846.2	99.8	90.9	0.389	38.810
10	720	$6.53 \cdot 10^{-6}$	3.27	749.9	196.1	188.8	0.234	45.955
10	730	$9.82 \cdot 10^{-6}$	4.91	661.3	284.7	283.3	0.169	48.155
10	740	$1.27 \cdot 10^{-5}$	6.35	576.4	369.6	365.5	0.136	50.279
20	760	$1.76 \cdot 10^{-5}$	8.82	437.3	508.7	503.7	0.102	51.820
20	780	$2.23 \cdot 10^{-5}$	11.17	321.3	624.7	626.4	0.082	51.326
20	800	$2.66 \cdot 10^{-5}$	13.28	243.1	702.9	704.8	0.070	49.209
20	820	$3.06 \cdot 10^{-5}$	15.31	209.7	736.3	733.8	0.061	45.141
30	850	$3.70 \cdot 10^{-5}$	18.51	201.4	744.6	746.3	0.051	38.160
30	880	$4.33 \cdot 10^{-5}$	21.63	198.1	747.9	750.4	0.044	33.053
60	940	$5.44 \cdot 10^{-5}$	27.18	194.7	751.3	753.3	0.035	26.663
60	1000	$6.42 \cdot 10^{-5}$	32.09	193.3	752.7	754.6	0.030	22.745



$$K_a = 5.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ (17\%)}$$

Stöchiometrie = 13:1 (Rezeptor : DNA)

5.4.2 Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assays

Bei den Ethidiumbromid-Verdrängungs-Experimenten wurde die Änderung der Emissionsintensität des in die DNA-Helix interkalierten Farbstoffes Ethidiumbromid durch sukzessive Zugaben von Rezeptor beobachtet.

Hierfür wurden 2 mL einer 1 μ M DNA-Stammlösung in Puffer (2 mM Hepes, Wasser/Methanol 1:1, 9.4 mM NaCl, pH 7.1) vorbereitet. In dieser wurden 1.26 μ M Ethidiumbromid pro DNA-Basenpaar gelöst und für 30 min inkubiert. Die Rezeptorlösung wurde durch Zugabe von 1 mL der DNA-Ethidiumbromid-Stammlösung zur Rezeptor-einwaage hergestellt.

Zu Beginn wurden 700 μ L der DNA-Ethidiumbromid-Stammlösung in eine rührbare 1.5 mL Quarzküvette überführt und ein Fluoreszenzspektrum bei einer Extinktion von 546 nm aufgenommen. Die Fluoreszenz-Intensität der Probe wurde bei einer Emission von 595 nm registriert und als 100%-Wert verwendet. Danach wurde die Rezeptorlösung sukzessiv zur DNA-Ethidiumbromid-Lösung titriert. Nach jeder Zugabe wurde die Lösung für 5 min inkubiert und ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Zur Nullwertbestimmung wurde das Fluoreszenzspektrum einer reinen Ethidiumbromidlösung gleicher Konzentration aufgenommen und die Fluoreszenz-Intensität bei 595 nm als 0% festgesetzt.

I_{rel} ist dabei die relative Fluoreszenzintensität, angegeben in %, und entspricht dem Prozentsatz an verdrängtem Ethidiumbromid. Zur Bestimmung der C_{50} -Werte wurde die relative Fluoreszenzintensität I_{rel} gegen die verwendeten Rezeptoräquivalente linear aufgetragen, und durch die erhaltene Geradengleichung ermittelt, indem für den y-Wert 50 eingesetzt wurde (50% Verdrängung). CE_{50} -Werte wurden als das Verhältnis der positiven Ladungen des Rezeptors zu den negativen Ladungen der DNA in der Komplexmischung berechnet.

5.4.3 DAPI-Verdrängungs-Assays

Für die DAPI-Verdrängungs-Experimente wurden 2 mL einer DNA-DAPI-Stammlösung in Puffer (2 mM Hepes, Wasser/Methanol 1:1, 9.4 mM NaCl, pH 7.1) mit den Konzentrationen 1 μ M DNA und 11 μ M DAPI hergestellt und für 30 min inkubiert. Die Rezeptorlösung wurde durch Zugabe von 1 mL der DNA-DAPI-Stammlösung zur Rezeptoreinwaage bereitgestellt.

Zu Beginn der Titration wurden 700 μ L der DNA-DAPI-Stammlösung in eine rührbare 1.5 mL Quarzküvette überführt und ein Fluoreszenzspektrum bei einer Extinktion von 364 nm aufgenommen. Die Fluoreszenz-Intensität der Probe wurde bei einer Emission von 451 nm registriert und als 100%-Wert verwendet. Die Rezeptorlösung wurde sukzessiv zur DNA-DAPI-Lösung titriert. Nach jeder Zugabe wurde die Lösung für 5 min inkubiert und ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Zur Nullwertbestimmung wurde das Fluoreszenzspektrum einer reinen 11 μ M DAPI-Lösung in Puffer aufgenommen und die Fluoreszenz-Intensität bei 451 nm als 0% festgesetzt.

Die Auswertung erfolgte analog dem Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay.

5.4.4 UV-Vis-Schmelzkurven

Zur Ermittlung der DNA-Schmelzkurven mit und ohne Rezeptor wurden reine 2 μM DNA-Lösungen und Lösungen mit 2 μM DNA und 60 μM Rezeptor angefertigt und in eine 1 mL Küvette überführt. Für die 12 BP DNA wurde als Puffer 1 mM Hepes in Wasser/Methanol 1:1, pH 7.1, und für die 20 BP DNA- und RNA-Doppelstränge 2 mM Hepes in Wasser/Methanol 1:1, 9.4 mM NaCl, pH 7.1 verwendet.

Zur Bestimmung der DNA-Schmelzkurven wurde die UV-Absorption der Probe in der Küvette bei einer Wellenlänge von 260 nm bei steigender Temperatur (von 20°C bis 85°C) gemessen. Durch Auftragung der UV-Absorption gegen die Temperatur wurde eine Schmelzkurve mit sigmoidalem Verlauf erhalten, deren Wendepunkt dem Schmelzpunkt entspricht. Durch Bildung der 1. Ableitung unter Verwendung des Programms *OriginPro 7.5*^[155] konnte die jeweilige Schmelztemperatur bestimmt werden.

5.4.5 CD-Spektroskopie

Für die Circular dichroismus-Messungen wurden 2.5 mL einer 1 μM DNA-Lösung mit und ohne 30 μM Rezeptor in 1 mM Hepes Puffer (Wasser/Methanol 1:1, pH 7.1) angefertigt. Die Spektren der Proben wurden bei 25°C über einen Wellenlängenbereich von 200-400 nm in einer 1 cm Küvette aufgenommen.

5.4.6 ^1H -NMR-Studien mit dem Dickerson-Dodecamer und Dimer 1

Für die ^1H -NMR-Messung wurde Dickerson-DNA der Sequenz 5'-CGCGAATTCGCG-3' verwendet. Die Konzentration der DNA und des Rezeptors betrugen jeweils 0.1 mM in einem Volumen von 600 μL . Als Lösungsmittel wurde $\text{MeOH-}d_4/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 verwendet.

Um ein vorzeitiges Ausfällen der Komponenten zu vermeiden, wurden die Proben wie folgt angesetzt:

0.1 mM Dickerson-DNA in $\text{MeOH-}d_4/\text{D}_2\text{O}$ 9:1: 60 μL einer 1 mM DNA-Lösung in D_2O wurden langsam zu 540 μL $\text{MeOH-}d_4$ pipettiert.

0.1 mM Rezeptor in $\text{MeOH-}d_4/\text{D}_2\text{O}$ 9:1: 60 μL D_2O wurden langsam zu 540 μL einer 0.11 mM Rezeptorlösung ($m = 0.133$ mg, $M = 2212.22$ g/mol) in $\text{MeOH-}d_4$ pipettiert.

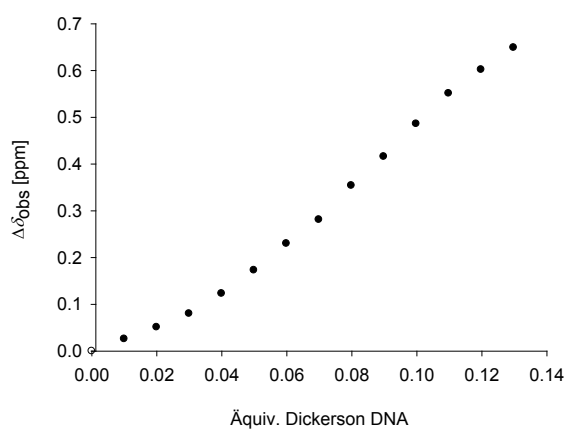
0.1 mM Dickerson-DNA und 0.1 mM Rezeptor in $\text{MeOH-}d_4/\text{D}_2\text{O}$ 9:1: 60 μL einer 1 mM DNA-Lösung in D_2O wurden langsam zu 540 μL einer 0.11 mM Rezeptorlösung ($m = 0.133$ mg, $M = 2212.22$ g/mol) in $\text{MeOH-}d_4$ pipettiert.

Für die Titrationen wurde ein NMR-Röhrchen mit 600 μL einer 0.1 mM Rezeptorlösung in $\text{MeOH-}d_4/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 bereitgestellt und eine 0.6 mM bzw. 0.12 mM DNA-Lösung in demselben Lösungsmittel. Nun wurden kontinuierlich gleiche Mengen der DNA-Lösung in das NMR-Röhrchen pipettiert und nach jeder Zugabe ein ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen.

¹H-NMR-Titration von Dimer 1 mit Dickerson-Dodecamer DNA

Rezeptor	Dimer 1	M (1) [g/mol]	2212.22
DNA	5'-CGC GAA TTC GCG-3'	m (1) [mg]	0.133
T [°C]	25	V (1) [mL]	0.6
Lösungsmittel	MeOH/D ₂ O 9:1 (pH 7.5)	[1] ₀ [mol/L]	1.0·10 ⁻⁴
		[DNA] ₀ [mol/L]	1.2·10 ⁻⁴

V ₀ [μL]	V _{Ges} [μL]	[DNA] [mol/L]	[DNA] / [1]	δ _{obs} [ppm]	Δδ _{obs} [ppm]
0	600	0	0.00	6.983	0.000
5	605	1.0·10 ⁻⁶	0.01	6.957	0.026
5	610	2.0·10 ⁻⁶	0.02	6.932	0.051
5	615	3.0·10 ⁻⁶	0.03	6.903	0.080
5	620	4.0·10 ⁻⁶	0.04	6.860	0.123
5	625	5.0·10 ⁻⁶	0.05	6.810	0.173
5	630	6.0·10 ⁻⁶	0.06	6.753	0.230
5	635	7.0·10 ⁻⁶	0.07	6.702	0.281
5	640	8.0·10 ⁻⁶	0.08	6.629	0.354
5	645	9.0·10 ⁻⁶	0.09	6.567	0.416
5	650	1.0·10 ⁻⁵	0.10	6.497	0.486
5	655	1.1·10 ⁻⁵	0.11	6.432	0.551
5	660	1.2·10 ⁻⁵	0.12	6.381	0.602
5	665	1.3·10 ⁻⁵	0.13	6.334	0.649



Aus der erhaltenen Bindungskurve konnte keine Assoziationskonstante bestimmt werden

6. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Å	Angström (1 Å = 0.1 nm)
abs.	absolut, wasserfrei
AFM	Rasterkraftmikroskop (atomic force microscope)
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
ber.	berechnet
Bn	Benzyl-
Boc	<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl
Boc₂O	Di- <i>tert.</i> -Butyldicarbonat
BP	Basenpaare
C	Cytosin
CD	Circulardichroismus
CH	Cyclohexan
Cl-HOBt	6-Chloro-1-Hydroxy-1 <i>H</i> -Benzotriazol
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol-hydrochlorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DCU	Dicyclohexylurea (Dicyclohexylharnstoff)
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4- <i>N,N'</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EA	Ethylacetat
EtBr	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumbromid)
EDCI	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethyl-carbodiimid-hydrochlorid
ESI	Elektronenspray-Ionisation
Et	Ethyl

eq.	Äquivalent(e)
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
Fl	Fluorescein (Resorcinphthalein)
G	Guanin
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
HAc	Essigsäure
Hepes	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorphosphat
HCTU	5-Chloro-1-[bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -benzotriazolium-3-oxid-hexa-fluorphosphat
His	Histidin
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektroskopie
HOBt	1-Hydroxy-benzotriazol
Hp	<i>N</i> -Methyl-3-Hydroxypyrrol
Hünig-Base	siehe DIEA
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
I	Intensität
ICD	induzierter Circular dichroismus
Im	<i>N</i> -Methylimidazol
k	kilo
kat.	katalytisch
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Molar (mol/L)
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
mM	Millimolar (mmol/L)
μM	Mikromolar (μmol/L)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

Mukaiyama	2-Chlorpyridin-1-methyl-pyridiniumiodid
neg.	negativ
NEt₃	Triethylamin
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie
obs.	observiert
OD	optische Dichte
pa.	per analysis
PDB	Proteindatenbank
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle (Katalysator)
Phe	Phenylalanin
PG	Prozentsatz an Wachstum (percentage growth)
PNA	Peptidnucleinsäure
pos.	positiv
ppm	parts per million
Py	<i>N</i> -Methylpyrrol
PyCloP	Chlor-tripyrrolidinphosphonium-hexafluorphosphat
quant.	quantitativ
R_f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
Schmp.	Schmelzpunkt
Stöch.	Stöchiometrie
T	Thymin
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorborat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbar (visible)
Z	Benzoxy-
Zers.	Zersetzung

7. Literaturverzeichnis

- [1] D. Nelson, M. Cox, *Lehninger Biochemie, Vol. 3*, Springer-Verlag, Berlin, **2001**.
- [2] M. J. Hannon, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 280.
- [3] A. Z. Fire, S. Q. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, 391, 806.
- [4] A. Z. Fire, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6966.
- [5] G. L. Sen, H. M. Blau, *FASEB J.* **2006**, 20, 1293.
- [6] T. Schrader, A. D. Hamilton, *Functional Synthetic Receptors*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [7] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022.
- [8] G. M. Cragg, D. J. Newman, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 52.
- [9] S. Neidle, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Academic Press, Elsevier Inc., London, **2008**.
- [10] W. D. Wilson, in *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Eds.: K. Nakanishi, D. Barton), Elsevier, New York, **1999**.
- [11] H. Deng, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides, G. J. Thomas, Jr., *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 3379.
- [12] A. D. Miller, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1862.
- [13] A. D. Miller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1768.
- [14] S.-E. Stiriba, H. Frey, R. Haag, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1385.
- [15] Y. Kakizawa, K. Kataoka, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, 54, 203.
- [16] W. C. Tse, D. L. Boger, *Chemistry & Biology* **2004**, 11, 1607.
- [17] P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2215.
- [18] S. Neidle, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 291.
- [19] D. S. Johnson, D. L. Boger, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 4* (Ed.: J. M. Lehn), Pergamon Press, Oxford, England, **1996**.
- [20] W. I. Sundquist, S. J. Lippard, *Coord. Chem. Rev.* **1990**, 100, 293.
- [21] N. Lomadze, H.-J. Schneider, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4403.
- [22] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2003**.
- [23] J. Koolman, K.-H. Röhm, *Taschenatlas der Biochemie, Vol. 3*, Thieme, Stuttgart, **2003**.
- [24] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737.
- [25] E. Vázquez, A. M. Caamano, J. L. Mascarenas, *Chem. Soc. Rev.* **2003**, 32, 338.
- [26] L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* **1961**, 3, 18.
- [27] R. Martínez, L. Chacón-García, *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 127.
- [28] G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2006**.
- [29] C. A. Frederick, L. D. Williams, G. Ughetto, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, A. H. Wang, *Biochemistry* **1990**, 29, 2538.
- [30] H. A. Ho, A. Najari, M. Leclerc, *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 168.
- [31] P. G. Baraldi, A. Bovero, F. Fruttarolo, D. Preti, M. A. Tabrizi, M. G. Pavani, R. Romagnoli, *Med. Res. Rev.* **2004**, 24, 475.
- [32] C. Zimmer, B. Puschendorf, H. Grunicke, P. Chandra, H. Venner, *Eur. J. Biochem.* **1971**, 21, 269.
- [33] R. M. Wartell, J. E. Larson, R. D. Wells, *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 6719.
- [34] F. Arcamone, V. Nicolell, S. Penco, P. Orezzi, A. Pirelli, *Nature* **1964**, 203, 1064.

- [35] M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 1376.
- [36] J. G. Pelton, D. E. Wemmer, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1393.
- [37] in <http://www.cgl.ucsf.edu/Outreach/Tutorials/GettingStarted.html>, **Stand: 15.01.2010**.
- [38] S. White, J. W. Szewczyk, J. M. Turner, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature* **1998**, 391, 468.
- [39] C. L. Kielkopf, S. White, J. W. Szewczyk, J. M. Turner, E. E. Baird, P. B. Dervan, D. C. Rees, *Science* **1998**, 282, 111.
- [40] M. Mrksich, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 3663.
- [41] M. Mrksich, M. E. Parks, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7983.
- [42] W. S. Wade, M. Mrksich, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8783.
- [43] S. White, J. M. Turner, J. W. Szewczyk, E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 260.
- [44] A. R. Urbach, J. W. Szewczyk, S. White, J. M. Turner, E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11621.
- [45] C. Melander, D. M. Herman, P. B. Dervan, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 4487.
- [46] U. Ellervik, C. C. C. Wang, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9354.
- [47] R. E. Bremer, N. R. Wurtz, J. W. Szewczyk, P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2093.
- [48] R. E. Bremer, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Chemistry & Biology* **1998**, 5, 119.
- [49] L. A. Dickinson, R. J. Gulizia, J. W. Trauger, E. E. Baird, D. E. Mosier, J. M. Gottesfeld, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12890.
- [50] S. Neidle, *Nucleic Acid Structure and Function*, Oxford University Press, Oxford, **2002**.
- [51] C. O. Pabo, L. Nekludova, *J. Mol. Biol.* **2000**, 301, 597.
- [52] P. Christen, R. Jaussi, *Biochemie*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2005**.
- [53] T. E. Ellenberger, C. J. Brandl, K. Struhl, S. C. Harrison, *Cell* **1992**, 71, 1223.
- [54] A. Klug, D. Rhodes, *Trends Biochem. Sci.* **1987**, 12, 464.
- [55] J. H. Laity, B. M. Lee, P. E. Wright, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, 11, 39.
- [56] S. A. Wolfe, L. Nekludova, C. O. Pabo, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, 29, 183.
- [57] J. M. Berg, H. A. Godwin, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, 26, 357.
- [58] Y. Choo, A. Klug, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 117.
- [59] L. Chen, J. N. M. Glover, P. G. Hogan, A. Rao, S. C. Harrison, *Nature* **1998**, 392, 42.
- [60] D. Jantz, B. T. Amann, J. Gregory J. Gatto, J. M. Berg, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 789.
- [61] J. B. Blanco, V. I. Dodero, M. Mosquera, L. Castedo, J. L. Mascarenas, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 8390.
- [62] J. B. Blanco, E. Vázquez, L. Castedo, J. L. Mascarenas, *Chem. Bio. Chem.* **2005**, 6, 2173.
- [63] J. B. Blanco, O. Vázquez, J. Martínez-Costas, L. Castedo, J. L. Mascarenas, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 4171.
- [64] E. Vázquez, A. M. Caamano, J. Martínez-Costas, L. Castedo, J. L. Mascarenas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4723.
- [65] O. Vázquez, E. Vázquez, J. B. Blanco, L. Castedo, J. L. Mascarenas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6886.
- [66] M. J. Hannon, V. Moreno, M. J. Prieto, E. Moldrheim, E. Sletten, I. Meistermann, C. J. Isaac, K. J. Sanders, A. Rodger, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 903.
- [67] I. Meistermann, V. Moreno, M. J. Prieto, E. Moldrheim, E. Sletten, S. Khalid, P. M. Rodger, J. C. Peberdy, C. J. Isaac, A. Rodger, M. J. Hannon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 5069.

- [68] T. Da Ros, G. Spalluto, M. Prato, T. Saison-Behmoaras, A. Boutorine, B. Cacciari, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 71.
- [69] N. T. Thuong, C. Hélène, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 666.
- [70] T. Le Doan, L. Perrouault, D. Praseuth, N. Habhouh, J. L. Decout, N. T. Thuong, J. Lhomme, C. Helene, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 7749.
- [71] H. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, *238*, 645.
- [72] T. J. Povsic, P. B. Dervan, *J. Biol. Chem.* **1989**, *111*, 3059.
- [73] P. A. Beal, P. B. Dervan, *Science* **1991**, *251*, 1360.
- [74] L. C. Griffin, P. B. Dervan, *Science* **1989**, *245*, 967.
- [75] D. A. Horne, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2435.
- [76] L. C. Griffin, L. L. Kiessling, P. A. Beal, P. Gillespie, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7976.
- [77] H. U. Stilz, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1993**, *32*, 2177.
- [78] T. E. Lehmann, W. A. Greenberg, D. A. Liberles, C. K. Wada, P. B. Dervan, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 2002.
- [79] P. E. Nielsen, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 545.
- [80] P. E. Nielsen, M. Engholm, R. H. Berg, *Science* **1991**, *254*, 1497.
- [81] D. Y. Cherny, B. P. Belotserkovskii, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Engholm, O. Buchardt, R. H. Berg, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 1667.
- [82] P. E. Nielsen, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 624.
- [83] V. Böhmer, M. A. McKewey, *Chemie in unserer Zeit* **1991**, *25*, 195.
- [84] C. D. Gutsche, R. Muthukrishnan, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4905.
- [85] C. D. Gutsche, *Calixarenes: An Introduction*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2008**.
- [86] C. D. Gutsche, M. Iqbal, *Org. Synth.* **1990**, *68*, 234.
- [87] C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2495.
- [88] J. M. Lehn, *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 49.
- [89] J. M. Lehn, *Pure Appl. Chem.* **1978**, *50*, 871.
- [90] J. M. Lehn, *Science* **1985**, *227*, 849.
- [91] J. M. Lehn, *Supramolecular Chemistry, Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, **1995**.
- [92] D. J. Cram, J. M. Cram, *Science* **1974**, *183*, 803.
- [93] D. J. Cram, T. Kaneda, R. C. Helgeson, G. M. Lein, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6752.
- [94] C. J. Pedersen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1021.
- [95] C. J. Pedersen, H. K. Frensdorff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1972**, *11*, 16.
- [96] A. Casnati, F. Sansone, R. Ungaro, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 246.
- [97] J. Vicens, V. Böhmer, *Calixarenes: A Versatile Class of Macrocyclic Compounds*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1991**.
- [98] L. Mandolini, R. Ungaro, *Calixarenes in Action*, Imperial College Press, London, **2000**.
- [99] J. Rebek, *Chem. Commun.* **2000**, 637.
- [100] R. Zadnarm, *Molekulare Kapseln und Protein-Rezeptoren auf Calixaren-Basis*, Marburg/Lahn, **2003**.
- [101] R. Zadnarm, M. Junkers, T. Schrader, T. Grawe, A. Kraft, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6511.
- [102] R. Zadnarm, T. Schrader, T. Grawe, A. Kraft, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1687.
- [103] H. Soon Park, Q. Lin, A. D. Hamilton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5105.
- [104] J. W. Cornforth, P. D. Hart, G. A. Nicholls, R. J. W. Rees, J. A. Stock, *Brit. J. Pharmacol.* **1955**, *10*, 73.
- [105] N. Ehlinger, S. Lecocq, R. Perrin, M. Perrin, *Supramol. Chem.* **1993**, *2*, 71.

- [106] D. N. Reinhoudt, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3476.
- [107] K. Araki, K. Iwamoto, S. Shinkai, T. Matsuda, *Chem. Lett.* **1989**, 1747.
- [108] A. Arduini, A. Pochini, S. Reverberi, R. Ungaro, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 981.
- [109] A. Arduini, A. Pochini, A. Secchi, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2325.
- [110] V. Böhmer, H. Goldmann, W. Vogt, J. Vicens, Z. Asfari, *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 1391.
- [111] K. Araki, K. Sisido, K. Hisaichi, S. Shinkai, *Tetrahedron Letters* **1993**, *34*, 8297.
- [112] R. Zadnırd, T. Schrader, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2703.
- [113] F. Sansone, M. Dudič, G. Donofrio, C. Rivetti, L. Baldini, A. Casnati, S. Cellai, R. Ungaro, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14528.
- [114] *SigmaPlot 10.0*, Systat Software, Inc., **2006**.
- [115] H. J. Schneider, R. Kramer, S. Simova, U. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6442.
- [116] A. Job, *Ann. Chem.* **1928**, 113.
- [117] B. F. Cain, B. C. Baguley, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 658.
- [118] A. R. Morgan, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, N. L. Murray, D. H. Evans, *Nucleic Acids Research* **1979**, *7*, 547.
- [119] D. L. Boger, B. E. Fink, M. P. Hedrick, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6382.
- [120] J. B. LePecq, C. Paoletti, *J. Mol. Biol.* **1967**, *27*, 87.
- [121] S. E. Wellman, *Biopolymers* **1996**, *39*, 491.
- [122] B. C. Baguley, W. A. Denny, G. J. Atwell, B. F. Cain, *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 170.
- [123] M. Lee, A. L. Rhodes, M. D. Wyatt, S. Forrow, J. A. Hartley, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4237.
- [124] M. A. Kostıainen, D. K. Smith, O. Ikkala, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7600.
- [125] M. A. Kostıainen, J. G. Hardy, D. K. Smith, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2612.
- [126] E. N. Zaitsev, S. C. Kowalczykowski, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 650.
- [127] O. Seitz, in *Highlights in Bioorganic Chemistry - Methods and Applications* (Eds.: C. Schmuck, H. Wennemers), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [128] G. Snatzke, *Angew. Chem.* **1968**, *80*, 15.
- [129] F. Snatzke, G. Snatzke, *Z. Anal. Chem.* **1977**, 285, 97.
- [130] G. Snatzke, in *Circular Dichroism: Principles and Applications, Second Edition* (Eds.: N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody), Wiley VCH, New York, **2000**.
- [131] B. Nordén, T. Kurucsev, *J. Mol. Recogn.* **1994**, *7*, 141.
- [132] M. Ardhammar, B. Nordén, T. Kurucsev, in *Circular Dichroism: Principles and Applications, Second Edition* (Eds.: N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody), Wiley-VCH, New York, **2000**.
- [133] W. C. Johnson, in *Circular Dichroism: Principles and Applications, Second Edition* (Eds.: N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody), Wiley-VCH, New York, **2000**.
- [134] B. Nordén, F. Tjerneld, *Biopolymers* **1982**, *21*, 1713.
- [135] P. E. Schipper, B. Nordén, F. Tjerneld, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *70*, 17.
- [136] R. Lyng, A. Rodger, B. Norden, *Biopolymers* **1991**, *31*, 1709.
- [137] W. Y. Zhong, J. S. Yu, Y. Q. Liang, K. Q. Fan, L. H. Lai, *Spectrochimica Acta Part A* **2004**, *60*, 2985.
- [138] C. D. Gutsche, M. Iqbal, D. Stewart, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 742.
- [139] S. Simaan, S. E. Biali, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7685.
- [140] M. Conner, V. Janout, S. L. Regen, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3744.
- [141] R. A. Jakobi, V. Böhmer, C. Grüttner, D. Kraft, W. Vogt, *New J. Chem.* **1996**, *20*, 493.
- [142] M. Saadioui, A. Shivanyuk, V. Böhmer, W. Vogt, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3774.

- [143] S. K. Maji, R. Banerjee, D. Velmurugan, A. Razak, H. K. Fun, A. Banerjee, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 633.
- [144] T. Mukaiyama, *Angew. Chem.* **1979**, 91, 798.
- [145] P. Rzepecki, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3016.
- [146] G. Sabatino, B. Mulinacci, M. C. Alcaro, M. Chelli, P. Rovero, A. M. Papini, *Lett. Pept. Sci.* **2002**, 9, 119.
- [147] A. Expósito, M. Fernández-Suárez, T. Iglesias, L. Muñoz, R. Riguera, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 4206.
- [148] R. J. Bergeron, J. S. McManis, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 1700.
- [149] S. Han, R. A. Moore, R. E. Viola, *Bioorg. Chem.* **2002**, 30, 81.
- [150] M. Dudič, A. Colombo, F. Sansone, A. Casnati, G. Donofrio, R. Ungaro, *Tetrahedron* **2004**, 60, 11613.
- [151] W. Hu, *unveröffentlichte Ergebnisse*, Universität Duisburg-Essen.
- [152] M. R. Crampton, I. A. Robotham, *J. Chem. Res.-S* **1997**, 22.
- [153] U. Sehlstedt, S. K. Kim, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 12258.
- [154] D. Joester, M. Losson, R. Pugin, H. Heinzelmann, E. Walter, H. P. Merkle, F. Diederich, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 1524.
- [155] *Origin Pro 7.5*, Origin Lab Corporation, **2003**.
- [156] L. Hernandez-Folgado, D. Baretic, I. Piantanida, M. Marjanovic, M. Kralj, T. Rehm, C. Schmuck, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 3036.
- [157] L. v. Dam, N. Korolev, L. Nordenskiöld, *Nucleic Acids Research* **2002**, 30, 419.
- [158] H. Ihmels, K. Faulhaber, G. Viola, in *Highlights in Bioorganic Chemistry - Methods and Applications* (Eds.: C. Schmuck, H. Wennemers), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [159] W. M. Nau, X. Zhang, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 555.
- [160] L. Hernandez-Folgado, C. Schmuck, S. Tomic, I. Piantanida, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2977.
- [161] M. Urbanová, P. Maloň, in *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry* (Ed.: C. A. Schalley), Wiley VCH, Weinheim, **2007**.
- [162] *MacroModel 9.0*, Schrödinger, Inc., Portland, OR.
- [163] D. R. Hare, D. E. Wemmer, S. H. Chou, G. Drobny, B. R. Reid, *J. Mol. Biol.* **1983**, 171, 319.
- [164] D. J. Patel, S. A. Kozlowski, L. A. Marky, C. Broka, J. A. Rice, K. Itakura, K. J. Breslauer, *Biochemistry* **1982**, 21, 428.
- [165] D. J. Patel, A. Pardi, K. Itakura, *Science* **1982**, 216, 581.
- [166] H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 2179.
- [167] R. Wing, H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Nature* **1980**, 287, 755.
- [168] B. Tartsch, G. Heinzmann, in *Proteincharakterisierung durch Gelpermeationschromatographie*, <http://www.bionity.com/articles/d/61630/>, **Stand 03.01.2010**.
- [169] P. L. Privalov, A. I. Dragan, C. Crane-Robinson, K. J. Breslauer, D. P. Remeta, C. A. S. A. Minetti, *J. Mol. Biol.* **2007**, 365, 1.
- [170] A. I. Dragan, C. M. Read, E. N. Makeyeva, E. I. Milgotina, M. E. A. Churchill, C. Crane-Robinson, P. L. Privalov, *J. Mol. Biol.* **2004**, 343, 371.
- [171] in Kooperation mit I. Piantanida (Division of Organic Chemistry and Biochemistry), M. Kralj und L. Šuman (Division of Molecular Medicine) vom Ruđer Bošković Institut, Zagreb, Kroatien, **Mai 2009**.
- [172] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.
- [173] M. R. Boyd, K. D. Pauli, *Drug Dev. Res.* **1995**, 34, 91.
- [174] R. Zadnard, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 904.

- [175] R. Zadmard, M. Arendt, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7752.
- [176] V. Böhmer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 713.
- [177] K. Iwamoto, A. Ikeda, K. Araki, T. Harada, S. Shinkai, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 9937.
- [178] K. Araki, A. Yanagi, S. Shinkai, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 6763.
- [179] M. Conner, I. Kudelka, S. L. Regen, *Langmuir* **1991**, *7*, 982.
- [180] C. Lottner, K.-C. Bart, G. Bernhardt, H. Brunner, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2079.
- [181] E. Nomura, H. Taniguchi, K. Kawaguchi, Y. Otsujit, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4709.
- [182] L. Baklouti, J. Cherif, R. Abidi, F. Arnaud-Neu, J. Harrowfield, J. Vicens, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2786.
- [183] V. Bocchi, D. Foina, A. Pochini, R. Ungaro, G. D. Andreotti, *Tetrahedron* **1982**, *38*, 373.
- [184] M. Ouchi, Y. Inoue, T. Kanzaki, T. Hakushi, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 1408.
- [185] A. Arduini, W. M. McGreggo, D. Paganuzzi, A. Pochini, A. Secchi, F. Ugozzoli, R. Ungaro, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1996**, 839.
- [186] A. Arduini, V. Böhmer, L. Delmau, J.-F. Desreux, J.-F. Dozol, M. A. G. Carrera, B. Lambert, C. Musigmann, A. Pochini, A. Shivanyuk, F. Ugozzoli, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 2135.
- [187] E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6141.
- [188] L. Huang, J. James C. Quada, J. W. Lown, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 21.
- [189] J. L. Toth, C. A. Price, E. C. Madsen, H. L. Handl, S. J. Hudson, I. Richard B. Hubbard, J. P. Bowen, K. Kiakos, J. A. Hartley, M. Lee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2245.
- [190] J. Klose, M. Bienert, C. Mollenkopf, D. Wehle, C.-W. Zhang, L. A. Carpinoc, P. Henklein, *Chem. Commun.* **1999**, 1847.
- [191] M. Maue, *Dissertation, Marburg* **2006**.
- [192] J. Coste, E. Frerot, P. Jouin, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437.
- [193] P. Rzepecki, H. Gallmeier, N. Geib, K. Cernovska, B. König, T. Schrader, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5168.
- [194] T. Shintou, T. Mukaiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7359.
- [195] E. Bald, K. Saigo, T. Mukaiyama, *Chemistry Letters* **1975**, 1163.
- [196] M. Mrksich, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3325.
- [197] B. F. Gisin, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 3102.
- [198] E. Pedroso, A. Grandas, X. Delasheras, R. Eritja, E. Giralt, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 743.
- [199] G. Luck, H. Triebel, M. Waring, C. Zimmer, *Nucleic Acids Res.* **1974**, *1*, 503.
- [200] D. Dasgupta, M. Rajagopalan, V. Sasisekharan, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1986**, *140*, 626.
- [201] *Organikum, Vol. 21., neu bearbeitete und erweiterte Auflage*, Wiley-VCH, **2001**.
- [202] D. D. Perrin, W. L. F. Armarengo, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, New York, **1988**.
- [203] A. Arduini, A. Pochini, A. Secchi, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2325.
- [204] C. J. Breitzkreuz, R. Zadmard, T. Schrader, *Supramolecular Chemistry* **2008**, *20*, 109.

LEBENS LAUF

Name: Caroline Julia Blecking

Geburtsdatum: 24.03.1982

Geburtsort: Velbert

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Geburtsname: Breitzkreuz

10/2006-03/2010 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Prof. Dr. T. Schrader

10/2006-03/2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis von Prof. Dr. T. Schrader am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen

09/2006 Abschluss: Diplom-Chemikerin

02/2006 – 09/2006 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen mit dem Thema „Synthese und supra-molekulare Eigenschaften der wasserlöslichen Phosphonat-Anthracen-Klammer“ unter Anleitung von Prof. Dr. F.-G. Klärner

02/2005 – 05/2005 Vertiefungspraktikum an der University of Wisconsin, Madison, USA mit dem Thema „Synthesis of 1,3-bis(1-naphthyl)-5-(2-naphthyl)-benzene and its deuterated analogue“ unter Anleitung von Prof. R. J. McMahon

09/2003 – 01/2006 Hauptstudium im Diplomstudiengang Medizinisch-Biologische Chemie an der Universität Duisburg-Essen

09/2001 – 08/2003 Grundstudium im Diplomstudiengang Chemie D II an der Universität Duisburg-Essen

06/2001 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

08/1992 – 06/2001 Geschwister Scholl-Gymnasium in Velbert

08/1988-06/1992 Gemeinschafts-Grundschule Birth in Velbert